

**Biomarcadores de respuesta al tratamiento con antimoniales y
mecanismos moleculares que controlan la supervivencia
intracelular de *Leishmania* en macrófagos humanos**

Deninson Alejandro Vargas González

Universidad del Valle

Facultad de Salud

Escuela de Ciencias Básicas

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Santiago de Cali

2018

**Biomarcadores de respuesta al tratamiento con antimoniales y
mecanismos moleculares que controlan la supervivencia
intracelular de *Leishmania* en macrófagos humanos**

Deninson Alejandro Vargas González

**Trabajo de grado para optar al título de Doctor en Ciencias
Biomédicas**

Directora de Tesis: María Adelaida Gómez PhD.

Universidad del Valle

Facultad de Salud

Escuela de Ciencias Básicas

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Santiago de Cali

2018

PÁGINA DE DICATORIA

Este el fruto de varios años dedicados a la investigación, cuyo sueño inicio desde que era apenas un niño. Siempre me despertó mucha curiosidad el entender cómo funcionaban las cosas y para mí no era suficiente el “porque sí” de mi Madre cuando no podía explicarme un fenómeno que escapaba a su conocimiento. Con Ella empieza mi aventura, pues fue la persona que siempre me motivo a seguir adelante y a no desfallecer frente a la adversidad. Hoy puedo decir que tampoco tengo todas las respuestas a sus preguntas, pero valoro que me enseñó a buscar las respuestas por mis medios. En este largo camino que apenas comienza, hubo muchas personas que aportaron su granito de arena quizás sin darse cuenta, mi Hermano, mi Hermana, mis Sobrinitos, mis Tíos, ¡Mi Familia!

También quiero dedicar este logro a mis Maestros, a los grandes maestros que me compartieron sus saberes para que construyera el mío. Desde la primaria hasta la universidad, siempre encontré ese guía que me ayudó a descubrir mi propio camino y aprendí de ellos que lo más importante no son los títulos académicos que ostentes, sino el ímpetu con el que desempeñan esta noble labor de educar a las nuevas generaciones con la ilusión de forjar un futuro mejor basado en el saber.

Quiero dedicar unas palabras especiales para la Dra. Nancy Saravia, quién siempre confió en mí y me brindó todo su apoyo en este proceso, además de ser un ejemplo a seguir con toda una vida dedicada a la investigación en Colombia y por los colombianos. Porque CIDEIM es una marca 100% Colombiana, ¡como Juan Valdez!

A mi Esposa, por su dedicación, comprensión y amor. Por ser esa persona que estuvo a mi lado sin dudar, apoyándose para sacar este logro adelante.

A mi tutora, la Dra. María Adelaida Gómez, a la cual nunca llamé doctora, no por falta de respeto, porque respeto y admiración me sobran hacía ella, sino por la confianza y apoyo que siempre me brindó durante este largo proceso, en el cual ahora empiezo una nueva etapa que espero perdure por toda mi vida. Para Ade sólo tengo palabras de agradecimiento pues fue mi última maestra y guía en ese largo proceso de formación académica que culmina hoy, pero su ejemplo seguirá aportando en mi camino ahora desde lo profesional y personal.

“Porque no existe un único camino, porque no existe una única respuesta, porque todo es posible gracias al apoyo de ustedes”.

PÁGINA DE AGRADECIMIENTOS

Quiero dar especial agradecimiento a todos los participantes con leishmaniasis que aportaron sus valiosas muestras para el desarrollo de esta investigación. A todo el personal de CIDEIM, a la Universidad del Valle, a COLCIENCIAS por mi beca de doctorado, al Newton Fund por ayudar a financiar mi pasantía internacional en la Universidad de Glasgow, al NIH y COLCIENCIAS que financiaron parte del proyecto.

También quiero dar agradecimientos especiales a David Gregory, quien me orientó y entrenó en la parte de ARN interferente durante mi pasantía en la Universidad de Harvard. Al Dr. Najib El-Sayed junto con Laura Dillon en la Universidad de Maryland, quienes me apoyaron en toda la parte de ARNseq. A Richard Buchmore, Karl Burgess y Christina Naula en la Universidad de Glasgow, por todo su apoyo en la parte de análisis y procesamiento de muestras para los estudios metabolómicos. Al Dr. Dan Zilberstein en Israel, por sus aportes en el diseño y análisis de los resultados en lo referente a las metalotioninas y la cuantificación del antimonio. Finalmente a todos mis compañeros de CIDEIM que me ayudaron en el proceso y en las correcciones de la tesis. ¡Muchas gracias a todos!

Contenido

1. Resumen	13
2. Planteamiento del problema y justificación	15
3. Preguntas de investigación	19
3.1. Objetivo general	19
3.2. Objetivo específico 1	19
3.3. Objetivo específico 2	19
4. Marco teórico	20
4.1. El tratamiento	20
4.1.1. Antimoniales	20
4.1.2. Miltefosine	22
4.2. El parásito	23
4.2.1. Mecanismos de resistencia frente a los antileishmaniales	25
4.2.2. Resistencia del parásito frente a los antimoniales	26
4.2.3. Resistencia del parásito frente al miltefosine	28
4.3. El hospedero	30
4.3.1. Manifestaciones clínicas:	30
4.3.1.1. Leishmaniasis visceral (LV)	30
4.3.1.2. Leishmaniasis cutánea (LC)	31
4.3.1.3. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)	32
4.3.2. Transporte, metabolismo y detoxificación de antileishmaniales en la célula hospedera: Antimoniales	32
4.3.3. Transporte, metabolismo y detoxificación de antileishmaniales en la célula hospedera: Miltefosine	34
4.4. Los biomarcadores como moléculas predictivas y pronósticas de respuesta terapéutica ..	35
4.4.1. Nuevas tecnologías empleadas en la identificación de biomarcadores	37
5. Declaración Ética	38
6. Capítulo 1	39
Interferones tipo I median la respuesta pro-inflamatoria inicial en macrófagos de pacientes con leishmaniasis cutánea con cura terapéutica.	39
Hallazgos principales	39
6.1. Antecedentes	39

6.2.	Materiales y métodos	40
6.2.1.	<i>Diseño del estudio</i>	40
6.2.2.	<i>Pacientes</i>	41
6.2.3.	<i>Obtención de CMSP y diferenciación a macrófagos</i>	41
6.2.4.	<i>Infección y exposición al Sb^V</i>	41
6.2.5.	<i>Perfiles transcriptómicos-ARNseq</i>	42
6.3.	Resultados	43
6.3.1.	<i>Los macrófagos primarios obtenidos de los pacientes que presentaron cura o falla terapéutica, evidenciaron perfiles transcriptómicos divergentes durante la infección y la exposición al Sb^V.</i>	43
6.3.2.	<i>Los macrófagos aislados de pacientes que curaron presentaron una fuerte modulación génica relacionada con procesos pro-inflamatorios, contrario a lo que ocurre en los macrófagos aislados de las fallas donde predominan los procesos de reparación celular y anti-inflamatorios.</i>	44
6.3.3.	<i>El factor de transcripción JUN fue identificado como el nodo principal de interacción entre los clústeres de histonas, vía de señalización de interferones tipo I y receptores acoplados a proteínas G en los macrófagos obtenidos de las curas.</i>	45
6.4.	Discusión	52
7.	Capítulo 2	55
	Las metalotioneínas del hospedero participan en la actividad antileishmanial de los antimoniales	55
	Hallazgos principales	55
7.1.	Antecedentes	55
7.2.	Materiales y métodos	57
7.2.1.	Reactivos	57
7.2.2.	Cultivo celular y diferenciación de las células THP-1	57
7.2.3.	Cultivo de parásitos, infección y ensayos de supervivencia intracelular	57
7.2.4.	Fabricación de los ARN cortos en horquilla (shARN) para el silenciamiento génico	58
7.2.5.	Ensayos de citotoxicidad celular	60
7.2.6.	Análisis estadístico	60
7.3.	Resultados	61
7.3.1.	<i>El silenciamiento génico de MT2-A no afecta la supervivencia intracelular de Leishmania</i>	61

7.3.2.	El silenciamiento de las MT en tándem es revertido por su fuerte inducción durante la infección por <i>Leishmania</i> y la exposición al Sb ^V	65
7.3.3.	El silenciamiento génico de MTF-1 reprime eficientemente la inducción de las MT 67	
7.3.4.	El silenciamiento génico de MTF-1 favorece la supervivencia intracelular de <i>Leishmania</i>	68
7.4.	Discusión.....	69
8.	Capítulo 3.....	73
	Perfilado metabólico y biomarcadores de respuesta terapéutica y de toxicidad del antimonio de meglumina en pacientes con leishmaniasis cutánea.....	73
	Hallazgos principales	73
8.1.	Antecedentes	74
8.2.	Materiales y métodos	74
8.2.1.	Diseño del estudio y participantes.....	74
8.2.2.	Control de calidad de datos clínicos.....	76
8.2.3.	Procesamiento de muestras y extracción de metabolitos	76
8.2.4.	Adquisición y procesamiento de datos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS)	76
8.2.5.	Control de calidad de los datos LC/MS.....	77
8.2.6.	Curación de datos y análisis estadístico	78
8.2.7.	Ensayos de infección <i>ex vivo</i> y evaluación de la supervivencia intracelular de <i>Leishmania</i>	79
8.3.	Resultados	80
8.3.1.	Características clínicas y demográficas de los participantes del estudio.....	80
8.3.2.	La exposición a Glucantime® altera el metaboloma en el plasma de los pacientes con LC 82	
8.3.3.	Los metabolitos asociados con la cicatrización de heridas y el equilibrio óxido/redox están diferencialmente modulados en los pacientes que curaron respecto de los que fallaron .	84
8.3.4.	La alantoína potencia la muerte de <i>L.V. panamensis</i> mediada por el Glucantime®.	91
8.4.	Discusión.....	92
9.	Resumen hallazgos principales	96
10.	Discusión General	97
11.	Representación gráfica de los hallazgos principales del estudio.....	100
12.	Bibliografía	101

13.	Anexos.....	133
13.1.	Aval Comité de Ética	133
13.2.	Entrenamientos y capacitaciones.....	135
13.3.	Publicaciones.....	135
13.4.	Participación en eventos científicos	136
13.5.	Habilidades en investigación aprendidas durante el desarrollo de mi tesis en CIDEIM. 137	

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .	24
Figura 2. Mecanismos de transporte y detoxificación del antimonio en amastigotes de <i>Leishmania</i> .	28
Figura 3. Mecanismos de transporte y detoxificación del MLF en amastigotes de <i>Leishmania</i> .	30
Figura 4. Mecanismos de transporte y detoxificación de compuestos antimoniales en macrófagos humanos.	34
Figura 5. Los perfiles transcriptómicos evidenciaron una respuesta diferencial de los macrófagos aislados de pacientes con divergente respuesta terapéutica.	44
Figura 6. Los macrófagos aislados de pacientes que curaron presentan una alta interacción de proteínas relacionadas con la respuesta inmune innata mediada por los interferones tipo I y vías de señalización celular acopladas a proteínas G.	47
Figura 7. Ampliación de los tres clúster principales identificados en los macrófagos aislados de pacientes que curaron: Interferones Tipo I, Histonas y vías de señalización dependientes de proteínas G.	49
Figura 8. Los macrófagos aislados de pacientes que fallaron al tratamiento presentaron una alta interacción entre los tres clúster identificados mediada por DAB2 y VAV3.	50
Figura 9. Amplificación de los clúster encontrados en los macrófagos aislados de pacientes que fallaron al tratamiento: clúster receptores de membrana acoplados a proteínas G, RhoGTPasa y señalización vía TFGβ.	51
Figura 10. La viabilidad celular de las células silenciadas es comparable a la de las células control.	61
Figura 11. El shARN bloquea la expresión de MT2-A en un 50%.	62
Figura 12. El silenciamiento de MT2-A ^{KD} no tienen ningún efecto en la supervivencia de <i>Leishmania</i> .	64
Figura 13. El silenciamiento en tándem de las MTs es revertido por su fuerte inducción bajo condiciones de estrés.	66
Figura 14. El silenciamiento del factor de transcripción MTF-1 inhibe la expresión de las MT.	68
Figura 15. <i>Leishmania V. panamensis</i> sobrevive en presencia del Sb ^V en las células MTF-1 ^{KD} .	69
Figura 16. Analisis de componentes principales de los datos metabolicos crudos.	82
Figura 17. Modelo OPLS-DA del metaboloma plásmatico después de la exposición al Glucantime®.	84
Figura 18. La exposición al Glucantime® altera el metaboloma plásmatico de pacientes con LC.	85
Figura 19. Metabolitos asociados con el balance redox y la cicatrización de heridas son más abundantes en los pacientes que curaron con el tratamiento.	87
Figura 20. Biomarcadores con potencial predictivo y pronóstico de respuesta y desenlace terapéutico.	90
Figura 21. La alantoína potencia el efecto leishmanicida del Sb ^V .	92
Figura 22. Mecanismos propuestos en este estudio que promueven la muerte de <i>Leishmania</i> a nivel intracelular en macrófagos humanos.	100

Tabla 1. Especies de <i>Leishmania</i> que infectan al humano y su presentación clínica. _____	25
Tabla 2. Categorías principales de ontología génica enriquecidas en los macrófagos primarios aislados de pacientes con divergente respuesta terapéutica. _____	46
Tabla 3. Cebadores empelados para las PCRs en tiempo real (RT-qPCR). _____	58
Tabla 4. shARN empleados para silenciar los genes de interes. _____	60
Tabla 5. Características clínicas y demográficas de los pacientes. _____	81
Tabla 6. Biomarcadores predictores de desenlace en las muestras de plasma pre-tratamiento _____	88
Tabla 7. Biomarcadores pronósticos de desenlace en las muestras de plasma post-tratamiento _____	89
Diagrama 1. Esquema general del procesamiento de las muestras para los análisis metabólicos.	75
Diagrama 2. Flujograma general del procesamiento y análisis de los datos metabólicos.	79

LISTAS ESPECIALES

AQP: Acuaglicero Proteínas

AUC: Área Bajo la Curva, por sus siglas en inglés

DAB-2: Disabled homolog 2

D-PBS: Buffer Fosfato Salino

EA: Eventos Adversos

FDR. Tasa De Falsos Descubrimientos, por sus siglas en inglés

GSH: Glutación

GSR: Glutación Reductasa

GSTM-3: Glutación S Trnasferasa M-3

LC: Leishmaniasis Cutánea

LV: Leishmaniasis Visceral

LMC: Leishmaniasis Mucocutánea

L.p.: Leishmania panamensis

LS/MS: Cromatografía líquida/Espectrometría de masas, por sus siglas en inglés

MLF: Miltefosine

MT: metalotioninas

MT-2A: Metalotionina 2-A

MTF-1: Metal Transcription Factor-1

MSI: Metabolomics Standards Initiative

NO: Óxido Nítrico

NBD: Dominio de Unión a Nucleótido, por sus siglas en inglés

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPLS-DA: Análisis discriminatorio ortogonal de mínimos cuadrados parciales, por sus siglas en inglés

PCA: Análisis de Componentes Principales, por sus siglas en inglés

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica

RAM: Reacciones Adversas al Medicamento

ARNseq: secuenciación del ARN

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno

ARNi: ARN interferente

ROC: Característica Operativa del Receptor, por sus siglas en inglés

RT-qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real, por sus siglas en inglés

SFB: Suero Fetal Bovino

Sb^V: Antimonio Pentavalente

Sb^{III}: Antimonio Trivalente

shARN: ARN interferente pequeño en horquilla

TSH: Tripanotión

TMD: Dominio Transmembranal, por sus siglas en inglés

TM: Transportador de Miltefosine

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humano

VAV-3: Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 3

1. Resumen

El control de la leishmaniasis cutánea (LC) para las Américas recae principalmente en el tratamiento antimonial. Sin embargo, la evaluación de la respuesta terapéutica presenta grandes limitantes, pues esta se determina hasta 6 meses después de haber iniciado el tratamiento, como un parámetro netamente clínico. Sumado esto a los reportes de falla terapéutica que oscilan entre un 20-30% para nuestra región y la alta toxicidad de la droga, colocan de manifiesto la necesidad de contar con biomarcadores de respuesta que permitan optimizar el seguimiento y el tratamiento de los pacientes con LC. Considerando lo anterior, este estudio se enfocó, desde la perspectiva del hospedero, en la identificación de biomarcadores de respuesta terapéutica en una cohorte retrospectiva de pacientes con LC que curaron y fallaron al tratamiento antimonial.

Como estrategia experimental para la identificación de biomarcadores de respuesta terapéutica se optó por el uso de herramientas “ómicas” como la transcriptómica y la metabolómica, para identificar aquellos perfiles de expresión génica y metabólicos relacionados con la cura o la falla al tratamiento antimonial. Los perfiles transcriptómicos realizados en macrófagos primarios obtenidos de los pacientes que curaron y fallaron (n=3/grupo), permitieron evidenciar una respuesta diferencial frente a la infección y la adición del antimonio. Los macrófagos obtenidos de los pacientes que curaron mostraron perfiles de expresión génica relacionados con una respuesta pro-inflamatoria mediada principalmente por los interferones tipo I. Por el contrario, los macrófagos obtenidos de los pacientes que fallaron mostraron una respuesta de cicatrización de heridas mediada principalmente por la vía de señalización del TGF- β . Adicionalmente, las metalotioneínas, única categoría de ontología génica significativamente inhibida en los macrófagos obtenidos de los pacientes que fallaron, se validaron funcionalmente *in-vitro* como proteínas que modulan la supervivencia intracelular de *Leishmania panamensis*, potencialmente a través de la unión del antimonio y su transporte al fagolisosoma favoreciendo la eliminación del parásito a nivel intracelular.

Por otro lado, los perfiles metabólicos realizados en muestras de plasma tomadas pre y post-tratamiento, de los pacientes con LC que curaron y fallaron (n=39), permitieron postular 4 metabolitos como potenciales biomarcadores tanto predictores como pronósticos

de respuesta terapéutica, la alantoína, la taurina, la N-acetilglutamina y el piruvato (AUC > 0.7, para todos). Adicionalmente, la alantoína mostró un efecto potenciador de la actividad leishmanicida del antimonio, evaluado en células mononucleares de sangre periférica de pacientes *in-vitro*, resaltando su potencial uso en co-terapias con el antimonio.

Finalmente, este estudio sienta las bases para futuros estudios de validación de biomarcadores de respuesta terapéutica en el contexto de la LC y muestra como el uso de las metodologías “ómicas” en enfermedades olvidadas permiten avanzar en el entendimiento de la enfermedad y el tratamiento.

2. Planteamiento del problema y justificación

La leishmaniasis, una enfermedad parasitaria transmitida por un vector del género *Phlebotomus* spp. para el viejo mundo, y *Lutzomyia* spp. para el nuevo mundo, es considerada una enfermedad tropical desatendida. Sus principales manifestaciones clínicas varían desde la leishmaniasis visceral (LV)-afectando principalmente el bazo y el hígado-, la leishmaniasis cutánea (LC), difusa y post-kala-azar -afectando principalmente la piel-, hasta la forma de leishmaniasis mucocutánea (LMC), -afectando principalmente la mucosa nasal y orofaríngea- (1). Actualmente se reportan en el mundo alrededor de 12 millones de personas afectadas, con 0.2 a 0.4 millones de casos nuevos al año para la LV y entre 0.7 y 1.2 millones de casos nuevos para la LC (2–5). La mayoría de los casos de la LC se reportan en Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Irán, Pakistán, Perú, Arabia Saudí y Siria (6). Colombia como país endémico, donde predomina la LC, reporta aproximadamente entre 10 mil a 20 mil casos nuevos al año, ocupando el segundo lugar en las Américas (3). Sin embargo, se estima que la carga de la enfermedad puede ser mucho mayor debido a que los centros de salud y de vigilancia epidemiológica dependen de la detección pasiva de casos, sólo los pacientes que consultan a los centros de atención quedan registrados en los sistemas de vigilancia nacional.

Las medidas actuales para el control de la transmisión y manejo de la enfermedad se basan principalmente en el control vectorial, el diagnóstico y el tratamiento con antileishmaniales. Como medicamento de primera línea en Colombia, se emplea el antimonio pentavalente (nombre comercial: Glucantime®) (7, 8), el cual lleva más de 100 años siendo empleado como monoterapia antileishmanial en el mundo y poco más de 40 años en Colombia (9–12). El Glucantime® debe ser administrado intramuscularmente durante 20 días a una dosis máxima de 20mg/kg/día según las guías nacionales (7), y su alta toxicidad, dolor en el sitio de aplicación, eventos adversos y contraindicaciones hacen que su aplicación se dé bajo estricta supervisión médica. Como medicamento de segunda línea se cuenta con el miltefosine (nombre comercial: Impavido®), medicamento de uso oral aprobado para su uso en Colombia a partir del año 2005 (7, 13). El miltefosine (MLF) debe ser administrado durante 28 días a una dosis máxima de 2,5mg/kg/día, y, al igual que el antimonio pentavalente (Sb^V), también se reporta alta toxicidad y efectos adversos. A pesar de las

dificultades terapéuticas, el Sb^V continúa siendo la primera opción de tratamiento para los pacientes con leishmaniasis en Colombia.

El desarrollo de nuevas terapias para el manejo clínico de la leishmaniasis ha sido un proceso lento y la implementación de nuevas medidas para su control podría tardar varios años más. Entre las alternativas terapéuticas de segunda línea disponibles en Colombia, además del MLF, se encuentran la pentamidina, cuya eficacia y seguridad ha sido reportado para *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* con un porcentaje de curación que oscila entre el 84% al 96% (7), y la anfotericina B, principalmente indicada en pacientes con leishmaniasis visceral o mucosa que fallaron al tratamiento de primera línea con antimoniales (7). Otros autores, en el contexto de ensayos clínicos, han reportado el uso de paramomicina, imiquimod, pentoxifilina, óxido nítrico (NO), entre otras (7, 8, 14). Sin embargo, se requieren más ensayos clínicos para probar su eficacia y emplearlos en el contexto clínico.

La respuesta terapéutica frente al tratamiento de la LC se define clínicamente como: la reepitelización total del tejido afectado sin signos de inflamación a la semana 13 después de iniciado el tratamiento, para la cura aparente, y a la semana 26 para establecer, o no, la cura definitiva (15–17). No obstante, una alta proporción de los pacientes en la región de las Américas que recibieron tratamiento antimonial durante el curso de ensayos clínicos presentaron falla terapéutica (15-60%) (18–20).

La falla terapéutica se ha convertido en un problema a nivel mundial, llegando a ser mayor al 65% en Bihar, India (21), donde los antimoniales ya no se recomiendan como terapia, colocando de manifiesto la necesidad de optimizar las terapias actuales acorde a las necesidades de la población. La resistencia intrínseca o adquirida del parásito a la droga es uno de los factores que se ha descrito como causante de falla (22–24). No obstante, factores del hospedero pueden contribuir a dicho desenlace, entre los que resaltan la respuesta inmune y la expresión de proteínas relacionadas con el transporte y metabolismo del medicamento (25–29), entre las cuales se han descrito los transportadores ABCA3, ABCB1, ABCB5, ABCB6, ABCC1 y las acuaporinas (AQP) implicadas en el transporte del medicamento (28–33). Por tal razón, la falla terapéutica debe ser entendida como un

fenómeno multifactorial donde participan el entorno, el parásito, el hospedero y el medicamento.

La falta de herramientas que ayuden a predecir el desenlace clínico de la enfermedad ha dificultado su manejo en diversas formas: 1) es necesario esperar hasta la semana 26 (6 meses después de iniciado el tratamiento) para evaluar la respuesta terapéutica definitiva, 2) se limita el uso de otras opciones terapéuticas o el cambio de tratamiento de forma temprana y oportuna a otra alternativa que podrían ser más eficaz para el paciente, 3) se expone al paciente a los efectos tóxicos de la droga, 4) dificulta el seguimiento del tratamiento a los pacientes que viven en zona rural dispersa y comunidades apartadas, que son la gran mayoría para el caso de la leishmaniasis, y 5) dificulta el diseño de ensayos clínicos para la evaluación de nuevas opciones terapéuticas dado los largos periodos de seguimiento para establecer la cura definitiva bajo los estándares actuales. Debido a estas limitaciones, se hace de vital importancia la identificación de biomarcadores de respuesta que permitan predecir el desenlace de la terapia y para esto, el entendimiento de los mecanismos moleculares que controlan el transporte, metabolismo y detoxificación de la droga juega un papel importante en la identificación de dichos biomarcadores. El estudio de la interacción parásito-hospedero-tratamiento en el contexto del tratamiento antimonial permitirán esclarecer mejor la interacción entre dichos factores e identificar potenciales biomarcadores con alguna utilidad clínica futura.

Los biomarcadores son moléculas empleadas para diagnosticar, pronosticar o monitorear un estado biológico particular. Entre los más conocidos se encuentran los niveles de glucosa para diagnosticar la diabetes, los niveles colesterol sérico para pronosticar el riesgo de enfermedad cardio-cerebro-vascular, los anticuerpos en el suero para el diagnóstico de infecciones como VIH, dengue, entre otras. Sin embargo, aún no se dispone de un biomarcador que permita predecir la respuesta terapéutica de los pacientes con leishmaniasis. Se han realizado varias aproximaciones en la búsqueda de estos biomarcadores que permitan clasificar a los pacientes con un mayor o menor riesgo de falla. Entre los factores que se han asociado con un mayor riesgo de falla resaltan, el tiempo de evolución de la enfermedad menor a dos meses, la terapia antileishmanial previa, prueba de Montenegro negativa o la mayor expresión de citoquinas como IL-1 β , IL-10, TNF α o de

la súper oxido dismutasa 1 (SOD1) (34–38). No obstante, su utilidad clínica y su uso en etapas tempranas del tratamiento aún no han sido probadas.

El advenimiento de las metodologías de alto rendimiento como la transcriptómica, la cual permite detectar los genes modulados bajo condiciones y tiempo específicas; la metabolómica, que aborda la identificación de los metabolitos en una muestra dada; y el ARN interferente, donde se bloquea la expresión de un gen determinado para evaluar su función, brindan nuevas posibilidades para el descubrimiento de biomarcadores que permitan avanzar en el diagnóstico, seguimiento, pronóstico y tratamiento de diversas patologías (39–42). En el cáncer, estas tecnologías se han empleado ampliamente en la búsqueda de nuevas moléculas que permitan detectar la enfermedad en sus estadios más tempranos, pronosticar la respuesta de los pacientes al tratamiento y evaluar la efectividad y toxicidad de las nuevas terapias (40, 43–45).

El propósito de este estudio es entender desde la perspectiva del hospedero, los mecanismos moleculares que modulan la supervivencia intracelular del parásito durante la exposición a los compuestos antimoniales, al igual que identificar biomarcadores plasmáticos asociados con la respuesta terapéutica que puedan ser empleados como biomarcadores tempranos de respuesta o desenlace al tratamiento de la LC causada por *L. Viannia*.

3. Preguntas de investigación

¿Están las funciones inmunológicas y de respuesta a antimoniales alteradas en los macrófagos de pacientes con LC que no responden al tratamiento con Glucantime®?

¿Pueden ser empleados los perfiles metabólicos en plasma para predecir la respuesta terapéutica al Glucantime® en pacientes con LC?

3.1. Objetivo general

Identificar biomarcadores de respuesta terapéutica en pacientes con leishmaniasis cutánea tratados con Glucantime®.

3.2. Objetivo específico 1

- Identificar y validar las funciones de los macrófagos humanos que controlan la supervivencia intracelular de *Leishmania* durante la exposición al antimonio pentavalente.

– *Indicadores:*

- Perfiles transcriptómicos (ARNseq) de macrófagos primarios de pacientes con divergente respuesta terapéutica evaluados.
- Funciones antimicrobianas y de respuesta de exposición a xenobióticos (antimoniales) expresadas diferencialmente en macrófagos humanos, identificadas y validadas.

3.3. Objetivo específico 2

- Identificar biomarcadores metabólicos predictivos de respuesta terapéutica durante el tratamiento con Glucantime® en pacientes con leishmaniasis cutánea.

– *Indicadores:*

- Depuración y normalización de la base de datos de metabolómica, realizada.
- Metabolitos candidatos como potenciales biomarcadores de respuesta terapéutica, identificados.

4. Marco teórico

4.1. El tratamiento

El antimonio trivalente (Sb^{III}) como terapia para la leishmaniasis fue introducido en 1912 por Gaspar Vianna en Brasil. Tres años después se introdujo su uso para el manejo de la leishmaniasis visceral en Europa. Para el año de 1922, se realizó un cambio importante en la molécula original con la introducción de la urea estibamine, el primero de los antimoniales pentavalentes (Sb^{V}) mucho más seguro y menos tóxico para los humanos que el Sb^{III} . La forma pentavalente de los antimoniales (encontrados comercialmente como: Glucantime® y Pentostam®) continúan siendo la terapia de primera línea para la leishmaniasis en diversos lugares endémicos del mundo (46). No obstante, en 1970 y 1980 en Kenia (África) y Bihar (India) respectivamente, se reportó un incremento significativo de pacientes con leishmaniasis visceral que fallaron a la terapia antimonial, encontrándose una alta proporción de parásitos resistentes al medicamento. En Bihar ya no se recomienda el uso de antimoniales, empleando actualmente como tratamiento de primera línea anfotericina B en combinación con MLF (46, 47). De acuerdo a las guías de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las opciones terapéuticas disponibles para el control de la leishmaniasis son: el antimonio pentavalente, el miltefosine, la anfotericina B, la paramomicina y la pentamidina (46). En el siguiente apartado se profundizará en el uso terapéutico de los dos antileishmaniales más usados, el antimonio y el miltefosine.

4.1.1. Antimoniales

El antimonio pentavalente es la primera línea de tratamiento contra la leishmaniasis en diversas zonas endémicas en el mundo, excepto en la mayor parte de Europa y el Subcontinente Indio, donde emplean la anfotericina B como droga de primera línea para el manejo de la leishmaniasis visceral (46, 47). A pesar de que los antimoniales llevan siendo empleados como droga antileishmanial por aproximadamente 100 años, su mecanismo de acción no se conoce con exactitud.

El Sb^{V} generalmente se administra intramuscular (IM) o intravenosamente (IV). Se comercializa en dos formas, como sodio estibogluconato (Pentostam®), y antimoniato de meglumina (Glucantime®). La concentración del principio activo (Sb) es variable en ambas

formulaciones con 85 mg Sb/mL para el Glucantime® y 100 mg Sb/mL para el Pentostam® (48). La dosis de administración estándar sugerida por la OMS y el Ministerio de Salud de Colombia es de 20 mg/kg/día durante 20 días. El modo de acción más ampliamente aceptado para los antimoniales es el modelo de pro-droga, donde el Sb^V debe ser reducido a Sb^{III} para ejercer su efecto leishmanicida (49, 50). Los efectos adversos más frecuentes con la administración de los antimoniales son mialgias y artralgias, problemas gastrointestinales, dolor de cabeza, fiebre, vómito, diarrea, exantema, eritema, entre otros (51). Adicionalmente, se han reportado eventos adversos serios como cardiomiopatías, falla renal y anormalidades hepáticas y pancreáticas reversibles, como elevación de las transaminasas generalmente a la semana de haber iniciado el tratamiento. La anormalidad cardíaca más frecuente es la prolongación del intervalo QTc en el electrocardiograma, recomendándose electrocardiograma de seguimiento para los pacientes mayores de 45 años (51, 52).

Una vez administrado el medicamento este alcanza un pico máximo de concentración plasmática (C_{max}) de 38.8 µg/mL entre las 0.5 a 2 horas, con un promedio de 1.5 horas. Para el caso de la leishmaniasis cutánea la acumulación de la droga en piel presenta un retraso respecto al C_{max} plasmático de 2.1 horas en promedio (52). La concentración máxima alcanzada en piel con una dosis estándar de 20 mg/kg/día es de 7.46 ± 7.7 µg/g de tejido. La eliminación del Sb es principalmente renal y oscila entre un 40 al 80% de la dosis inicial administrada en las primeras 24h. Sin embargo, a pesar de su corta vida media, algunos estudios han reportado que la eliminación total de la droga puede tardar 36 días, e incluso hasta más de 50 días (52).

El antimonio no se recomienda en mujeres embarazadas o que se encuentren en periodo de lactancia, tampoco es recomendado en personas que tengan problemas cardíacos de base o falla renal severa, dado que su eliminación es principalmente por vía renal (52). Las mujeres en edad fértil que reciban tratamiento antimonial, se les debe administrar algún método de planificación familiar, dado que la droga puede tener efectos teratogénicos para el feto (7, 52, 53).

La mayoría de los datos reportados de farmacocinética del medicamento, son de estudios realizados en adultos y se asume que la misma dosis terapéutica puede ser empleada en

niños. No obstante, algunos autores han demostrado que los niños eliminan mucho más rápido el antimonio por lo que es necesario realizar más estudios en esta población para ajustar las dosis del fármaco (52).

4.1.2. Miltefosine

El MLF (alquilfosfocolina) es una molécula que posee una cabeza polar y una cola hidrofóbica. Se usa en Colombia en pacientes con leishmaniasis cutánea a partir del año 2005 y al igual que el antimonio su mecanismo de acción exacto se desconoce. Algunas hipótesis sobre su mecanismo de acción se enfocan en su capacidad de inducir la apoptosis celular, alteración de la composición lipídica de la membrana plasmática y de las vías de señalización dependientes de lípidos, al igual que se le han atribuido efectos modulares de la respuesta inmune (52).

MLF es la única droga antileishmanial de administración oral y la dosis estándar recomendada es de 2.5 mg/kg durante 28 días. Sus principales reacciones adversas se asocian a molestias gastrointestinales, náuseas, vómito y diarrea. El MLF es de absorción lenta, con un tiempo medio de 2 horas. En humanos, la unión a albúmina es de aproximadamente el 97% y se acumula dos veces más en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) respecto al plasma (52). Su metabolismo se da a nivel intracelular mediado principalmente por la fosfolipasa D y su excreción renal es menor al 0.2%. El MLF posee una vida media de aproximadamente 31 días y puede requerir hasta 6 meses para su eliminación total (52).

El MLF, al igual que el antimonio, no se recomienda en mujeres embarazadas o que se encuentren en periodo de lactancia. Las mujeres en edad fértil que reciban MLF se les debe administrar algún método de planificación familiar, pues la droga puede tener efectos teratogénicos (7, 52, 53).

Finalmente, el MLF también es eliminado más rápido en los niños por lo que es necesario realizar más estudios para ajustar las dosis y no seguir exponiéndolos a dosis subterapéuticas (52, 54).

4.2. El parásito

La primera evidencia de la existencia de un ancestro de *Leishmania* data desde hace 100 millones de años, a partir del descubrimiento de un ámbar fósil que conservaba el vector con el parásito en su interior (55). Pero no fue sino hasta finales del siglo XIX y principios del siglo XX donde el agente etiológico fue identificado por primera vez (46). El nombre actual de *Leishmania* se le debe a Ronald Ross, quién sugirió dicho nombre en honor al Teniente General Sir William Boog Leishman (1843-1914), uno de los primeros investigadores en reportar el parásito como el agente etiológico de la enfermedad (46).

Leishmania es un parásito que presenta un ciclo de vida digenético, parte de su ciclo lo desarrolla en el vector y la otra parte en el hospedero (Figura 1). El género *Leishmania* se divide en dos grandes subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, cuya clasificación se originó a partir de su desarrollo en el vector: el subgénero *Leishmania* tiene un desarrollo suprapilarica en el vector (unión entre el intestino medio y alto), mientras que el subgénero *Viannia* tiene un desarrollo peripilarica (46, 56, 57). El ciclo del parásito en el vector inicia cuando una mosca hembra no infectada se alimenta de sangre de un hospedero mamífero infectado con el parásito. Las células infectadas del hospedero ingresan al intestino del vector liberando los amastigotes intracelulares e iniciando su conversión a promastigotes procíclicos. Una vez han completado su desarrollo, los promastigotes metacíclicos, forma infectiva del parásito, migran hacia la probóscide del vector preparándose para infectar a un nuevo hospedero en el momento de una nueva ingesta de sangre (57). Ya en el hospedero, los promastigotes metacíclicos ingresan principalmente a los macrófagos, donde inician nuevamente su conversión a amastigotes intracelulares, su proceso de replicación e infección de otros macrófagos (Figura 1) (58).

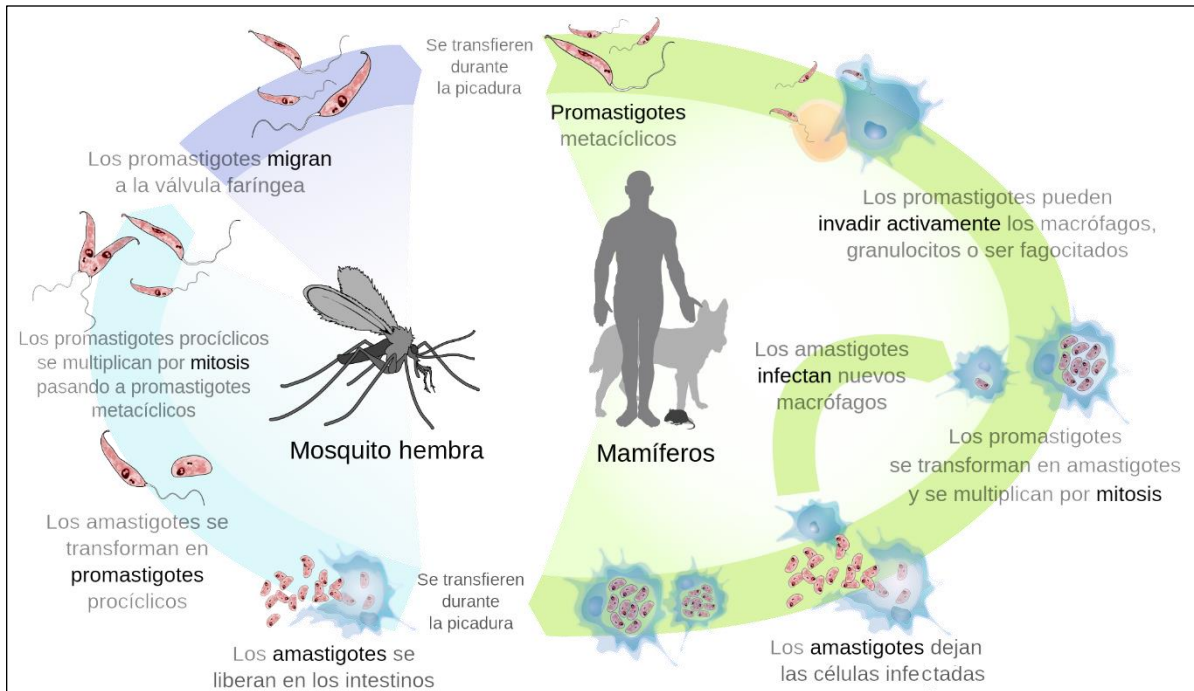


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*.

La parte izquierda (azul) representa el ciclo del parásito en su forma de promastigotes en el vector (*Lutzomyia* o *Phlebotomus*). La parte derecha (verde) representa el ciclo del parásito en el hospedero humano u otros mamíferos en su forma de amastigotes intracelulares. Tomado de: Harhay M. O. et. al. (2011), Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil, Trends in Parasitology, con autorización de Elsevier (59).

Leishmania como promastigote flagelado extracelular, cuya forma encontramos en el vector puede llegar a medir de 15 a 20 μm . Como amastigote intracelular obligado, no posee flagelo y puede llegar a medir de 3 a 5 μm (58). Actualmente existen más de 20 especies de *Leishmania*, y aquellas de importancia médica tanto para el viejo mundo como para el nuevo mundo, al igual que su presentación clínica más frecuente se mencionan en la tabla 1 (46, 58).

Tabla 1. Especies de *Leishmania* que infectan al humano y su presentación clínica.

Sub-genero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Viejo mundo	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killickia</i> ¹		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
Nuevo mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. pifanoia</i> ¹	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. garnhamia</i> ¹	<i>L. naïffi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombiensis</i> ²	
Tropismo principal	Viscerotrópica	Dermotrófica	Dermotrópica	Mucotrópica

¹ Estatus de las especies bajo discusión

² Reclasificada como *Endotrypanum colombiensis*

Adaptado de: WHO Technical Report Series, Control of the leishmaniasis, 2010 (46).

4.2.1. Mecanismos de resistencia frente a los antileishmaniales

La emergencia de resistencia del parásito frente a los antileishmaniales es una problemática que cada vez alcanza mayor relevancia, cuya gravedad se acentúa por las escasas alternativas terapéuticas disponibles (5 para tratamiento sistémico según la OMS) (14, 60, 61). Como ejemplo, para el caso de la región de Bihar (India), el uso de los antimoniales ya no es recomendado por la alta proporción de parásitos resistentes y su asociación con la falla terapéutica, alcanzado niveles del 65% (60). Actualmente para esta región se emplean esquemas de anfotericina B en combinación con miltefosine (MLF) (60). A continuación, se discuten brevemente los mecanismos de resistencia en *Leishmania* para los dos antileishmaniales más usados en el mundo, antimoniales y MLF.

4.2.2. Resistencia del parásito frente a los antimoniales

El mecanismo de acción de los antimoniales no se conoce completamente. Sin embargo, se discute que su efecto puede ser generalizado promoviendo el estrés oxidativo y alterando el equilibrio óxido/redox mediante el agotamiento del tripanotión (TSH) e inhibición de enzimas claves que participan en su síntesis (γ Glutathion sintetasa y la Ornitina descarboxilasa), inhibiendo la β -oxidación, inhibiendo la actividad de diversas enzimas que poseen residuos de cisteínas con grupos tiol disponibles y promoviendo la fragmentación del ADN (60, 62–64).

El TSH es el principal agente reductor en el parásito, y está compuesto por la unión de dos moléculas de glutatión (GSH) y una de espermidina. Su mayor concentración en el parásito se ha relacionado con resistencia. Para la cual, la mayor expresión de la glutatión sintetasa y ornitina descarboxilasa juegan un papel importante en el incremento de su síntesis favoreciendo el fenotipo de resistencia (60, 64). La acuagliceroproteína 1 (AQP1) es una de las principales proteínas implicadas en el ingreso del antimonio trivalente (Sb^{III}) al interior del parásito. La inhibición de AQP1 disminuye el ingreso de la droga y se asocia con resistencia al Sb. Por el contrario, la sobre-expresión de AQP1 en cepas resistentes, revierte su fenotipo de resistente a susceptible (60, 64, 65).

Se acepta ampliamente que el antimonio pentavalente (Sb^{V}) es una pro-droga que debe ser reducida al antimonio trivalente (Sb^{III}), para ejercer su efecto leishmanicida. Dicha reducción se puede dar tanto en la célula hospedera como en el parásito, donde el GSH/TSH juega un papel importante en la interconversión de la droga a su forma activa. Por otra parte, el TSH puede tener un papel dual, activando la droga pero también uniéndola, formado complejos TSH-antimonio, que posteriormente son detoxificados del parásito a través de su acumulación intravesicular o eflujo mediante transportadores dependientes de ATP tipo ABC (60, 64, 66, 67).

Los transportadores tipo ABC son una de las familias de proteínas más grandes conservadas evolutivamente. La estructura de estos transportadores consta de dominios transmembranales (TMD) y un dominio de unión a nucleótidos, conocido como NBD. El dominio NBD posee una región altamente conservada conocida como “la firma ABC”, que es característica de esta superfamilia (66, 68). Los transportadores ABC están implicados

en diversas actividades fisiológicas principalmente relacionadas con el transporte de moléculas a través de las membranas biológicas mediante la hidrólisis de ATP. Entre los sustratos conocidos para este tipo de transportadores se encuentran los lípidos, los esteroides, los péptidos, iones, metales pesados, toxinas, nucleótidos, carbohidratos y azúcares. La sobreexpresión de estos transportadores ha sido asociada con resistencia a múltiples drogas tanto en el parásito como en las células del hospedero (68).

Los transportadores ABCB1 y ABCC3, se han reportado como proteínas importantes en la resistencia de *Leishmania* frente a As^{III} y Sb^{III} , localizados en pequeñas vesículas cercanas al bolsillo paraflagelar, participando en el secuestro de los conjugados TSH-antimonio, bloqueando así su efecto leishmanicida (60, 64, 69). Otro transportador tipo ABC, ABCI4, localizado en la membrana plasmática, se asoció con el eflujo del Sb^{III} favoreciendo los fenotipos de resistencia (60, 64). Por otro lado, el transportador ABCI3 se asoció con la entrada del Sb^{III} , donde los parásitos ABCI3^{+/-} presentaron un fenotipo de resistencia a los antimoniales (Figura 2) (70).

Los mecanismos descritos previamente no son generalizables a todas las especies de *Leishmania*, e incluso pueden llegar a variar entre las mismas especies que comparten fenotipos de resistencia al antimonio. Parte de esta discrepancia se debe a las diferencias intrínsecas de cada especie, y a que varios de los estudios se realizaron en cepas seleccionadas por presión de medicamento en el laboratorio, cuyos hallazgos no necesariamente se mantienen en las cepas clínicas (71), indicando que existe una amplia heterogeneidad en los fenotipos de resistencia encontrados.

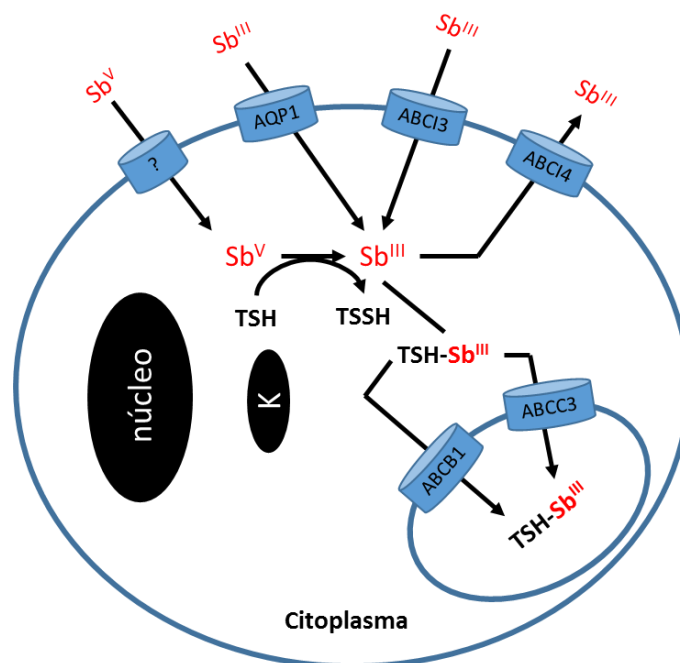


Figura 2. Mecanismos de transporte y detoxificación del antimonio en amastigotes de *Leishmania*.

AQP1 y ABCI3 facilitan el influjo del Sb^{III} al parásito. De otro lado, ABCI4 facilita el eflujo. Un transportador aún no descrito permite el ingreso del Sb^{V} donde el TSH puede reducirlo a su forma trivalente (Sb^{III}), pero también puede unir el Sb formando complejos TSH-Sb que posteriormente son detoxificados del parásito a través de vesículas intracelulares, donde ABCB1 y ABCC3 media dicho transporte. K: kinetoplasto

4.2.3. Resistencia del parásito frente al miltefosine

Al igual que el antimonio, el mecanismo de acción del miltefosine (MLF) no se conoce completamente. Su efecto leishmanicida parecer estar mediado por la apoptosis celular, la cual se sustenta en observaciones previas donde el parásito presentó contracción celular, fragmentación y condensación del ADN nuclear y exposición de la fosfatidilserina de la parte interna a la parte externa de la membrana plasmática (60, 72, 73).

Estudios realizados en cepas seleccionadas por presión de medicamento en el laboratorio mostraron que la resistencia al MLF puede ser mediada por diferentes transportadores de membrana, entre los cuales encontramos ABCB1, ABCG-4 y ABCG-6 (74–76), al igual que el “transportador de miltefosine” (TM) (77). La familia de los transportadores ABCG ha sido implicada en el transporte de lípidos, y el MLF es un análogo estructural de la

fosfatidilcolina, lo que facilita su transporte (78). ABCB1, ABCG-4 y 6 fueron descritos como bombas de eflujo localizados en la membrana del parásito cuya sobreexpresión disminuía la acumulación intracelular del MLF promoviendo la resistencia frente a la droga (74–76). Contario a los transportadores ABCG que median el eflujo del MLF, el transportador TM, proteína implicada en la translocación de glicerofosfolípidos de membrana, participa en el influjo del MLF (Figura 3). Las mutaciones o la baja expresión de dicho transportador se han asociado con resistencia, al disminuir el ingreso de la droga. Adicionalmente, se encontró que la proteína TM no actúa sola, y que requiere de una subunidad β complementaria conocida como Ros3, por lo que la deficiencia en alguna de las dos genera el mismo fenotipo de resistencia al MLF (79).

Recientemente se encontró que la resistencia a MLF generada por mutaciones en el TM, también pueden generar resistencia cruzada a la anfotericina B (47), primera línea de tratamiento contra la leishmaniasis visceral en Europa, al igual que en ciertas regiones del Subcontinente Indio. El MLF es una molécula con una vida media muy larga (150 a 200 horas), lo que genera un ambiente ideal para la selección de clones resistentes a la droga expuestos a dosis sub-terapéuticas (60, 80). La vida media larga del MLF, la emergencia de resistencia y su resistencia cruzada con otros antileishmaniales complica el panorama y plantea el interrogante sobre lo adecuado de los esquemas terapéuticos actuales para prevenir la resistencia generalizada frente a las pocas opciones terapéuticas existentes.

Ahora, si se considera que el parásito no es un ente independiente, que se encuentra a nivel intracelular en la célula hospedera y que el medicamento debe llegar al fagolisosoma para poder ejercer su efecto leishmanicida, el hospedero cobra un papel relevante en el metabolismo de la droga y en la respuesta terapéutica.

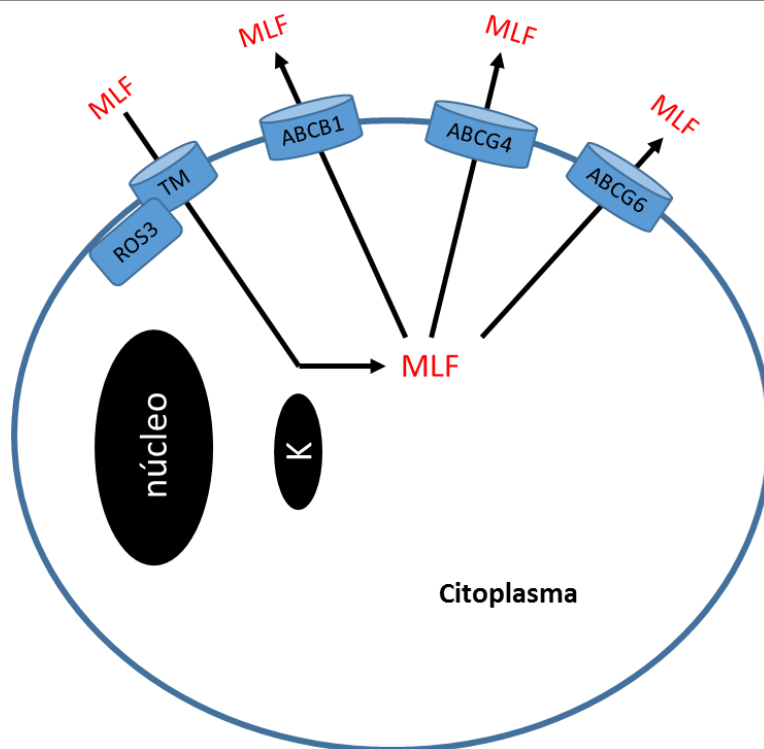


Figura 3. Mecanismos de transporte y detoxificación del MLF en amastigotes de *Leishmania*.

El transportador del MLF (TM) y la proteína acopladora Ros3 participan en el influjo del MLF. Por otro lado, los transportadores ABCB1 y ABCG4/6 participan en el eflujo del MLF. K: kinetoplasto.

4.3. El hospedero

Reportes de la presencia del parásito en el hospedero humano datan desde los años 2050-1650 A.C. (55). Sin embargo, el agente etiológico y su forma de transmisión sólo fue descrita hasta finales del siglo XIX y principios del siglo XX. Las formas clínicas de la leishmaniasis varían desde su presentación visceral, hasta la forma cutánea y mucocutánea. Su presentación depende de la especie de *Leishmania* infectante, de la localización geográfica (Tabla 1), y del estado inmune del hospedero.

4.3.1. Manifestaciones clínicas:

4.3.1.1. Leishmaniasis visceral (LV)

Principalmente causada por *L. donovani* y *L. infantum* para el viejo mundo y *L. infantum* (antes *L. chagasi*) para el nuevo mundo. El grupo de edad mayormente afectado son los niños menores de 10 años y adultos jóvenes inmunosuprimidos o infectados con VIH (46).

El periodo de incubación de la enfermedad oscila entre 10 días hasta 1 año y su inicio es gradual, aunque puede ser abrupto en personas no expuestas de zonas no endémicas que visitan zonas endémicas. Los síntomas suelen ser inespecíficos y entre los más comunes se presentan fiebre, malestar general, escalofríos, pérdida de peso, anorexia, malestar en el hipocondrio izquierdo, esplenomegalia con o sin hepatomegalia. También se presenta desgaste y palidez de las membranas mucosas. Las lesiones cutáneas, conocidas como post Kala-azar (presentación cutánea de la leishmaniasis visceral) pueden estar presentes, pero no son comunes en Sur América. De no ser tratada la enfermedad puede ser mortal.

4.3.1.2. Leishmaniasis cutánea (LC)

Se han descrito diferentes formas clínicas de la leishmaniasis cutánea como lo son la forma localizada, diseminada, difusa, atípica, mucocutánea y post Kala-azar.

Los signos clínicos de la enfermedad cutánea comienzan como un nódulo o una pápula en el sitio de inoculación del parásito por el vector. La lesión va creciendo lentamente hasta formar la úlcera característica en la piel con bordes levantados e indurados, una vez se cura, deja una cicatriz deprimida con pigmentación alterada. Dependiendo la especie infectante se habla de úlcera seca (*L. tropica*) o úlcera húmeda (*L. major*) para el viejo mundo. El periodo de incubación oscila entre 2 a 8 meses. La forma difusa de la enfermedad es causada por *L. aethiopica* y se caracteriza por la amplia diseminación de máculas, pápulas, nódulos o placas (46).

Para el nuevo mundo, ambos subgéneros (*Leishmania* y *Viannia*) pueden provocar la forma cutánea localizada y el inicio y aparición de la úlcera es similar a la del viejo mundo. Sin embargo, pueden haber algunas manifestaciones cutáneas atípicas. La forma mucocutánea se asocia principalmente a *L. braziliensis* y *L. panamensis*, llegando a causar deformidad facial por deterioro de la mucosa nasal, orofaríngea y la ruptura del septo nasal y paladar. La forma difusa se asocia principalmente a *L. mexicana* y *L. amazonensis*, esta condición no cura espontáneamente, pero no se presenta compromiso de mucosa nasal. La forma diseminada se presenta con nódulos y úlceras dispersas en el cuerpo, asociándose principalmente con *L. panamensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis* (46).

El post Kala-azar se presenta principalmente en áreas endémicas para *L. donovani*, siendo frecuente en África del Este y el Subcontinente Indio. Generalmente las lesiones cutáneas aparecen 6 meses a 1 año después de la cura aparente de la leishmaniasis visceral, pero puede aparecer antes o incluso en simultáneo con la forma visceral (46).

4.3.1.3. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

La leishmaniasis mucocutánea está normalmente asociada a complicaciones de la forma cutánea, involucrando principalmente a las especies de *Leishmania* del nuevo mundo. Estas manifestaciones clínicas pueden aparecer un año después de resolver la forma cutánea hasta varios años después (46). Las manifestaciones mucocutáneas pueden afectar tanto la mucosa nasal como orofaríngea, llegando a destruir el septo nasal y el paladar, generando lesiones desfigurantes en los pacientes. Se estima que aproximadamente entre 1% al 10% de los pacientes que presentan la forma cutánea pueden evolucionar a la forma mucocutánea con especies infectantes del nuevo mundo (46).

4.3.2. **Transporte, metabolismo y detoxificación de antileishmaniales en la célula hospedera: Antimoniales**

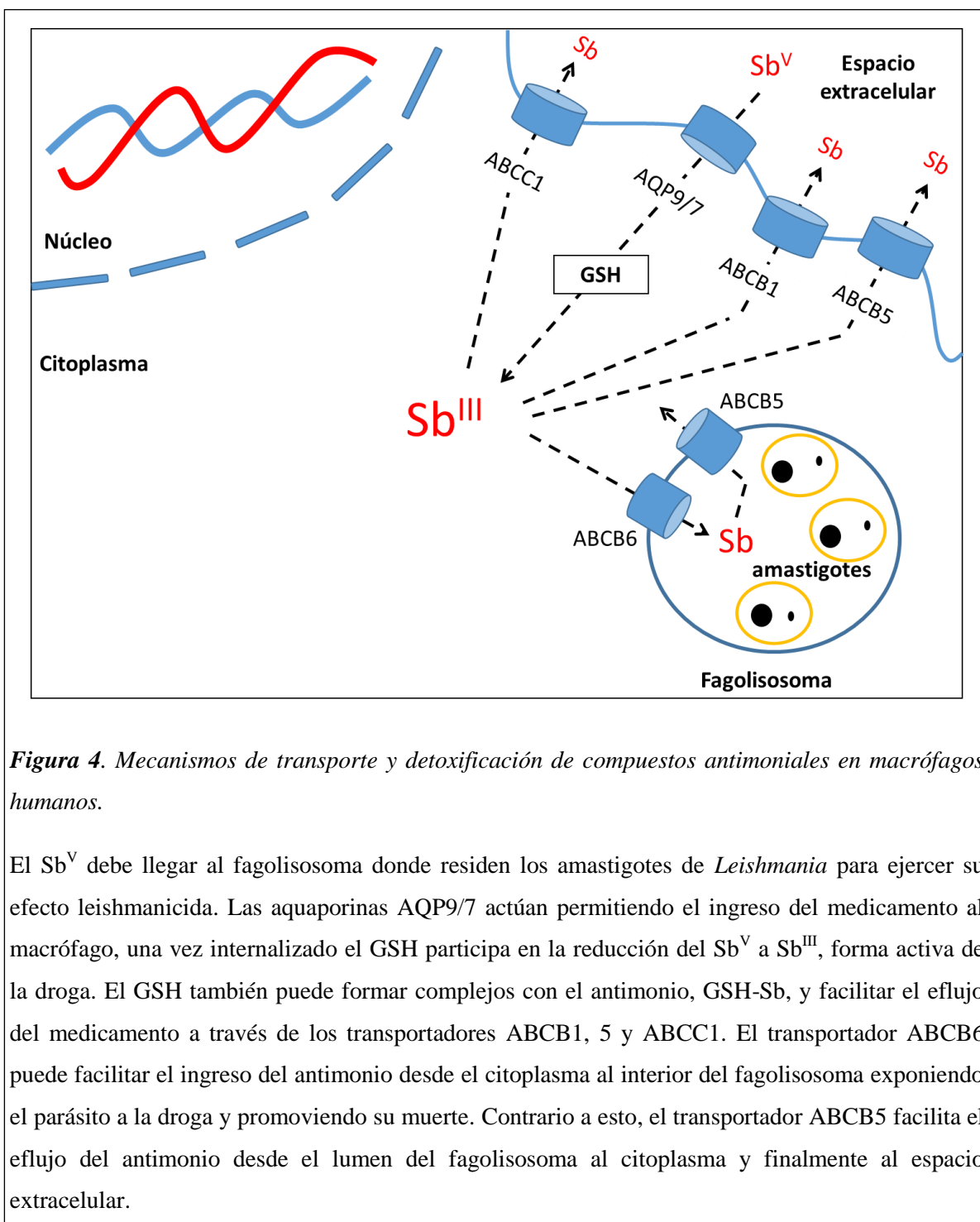
Durante más de dos décadas, la investigación en el contexto de la falla terapéutica y la resistencia frente a los antileishmaniales se enfocó en buscar factores exclusivos del parásito asociados a la resistencia, logrando caracterizar algunos transportadores y enzimas con un papel importante en la resistencia del parásito frente a la droga. No obstante, otros estudios también demostraron que infecciones con cepas resistentes a los antileishmaniales no siempre cursan con falla terapéutica y vice-versa (81), resaltando el papel que juega el hospedero en dicha respuesta final.

Recientemente, la investigación ha girado en torno a entender los mecanismos de la célula hospedera que modulan la supervivencia intracelular del parásito y controlan el metabolismo de la droga. En términos pragmáticos, la célula hospedera representa una barrera que debe ser atravesada por la droga antes de alcanzar el parásito, en este sentido es lógico pensar que los macrófagos desempeñan un rol importante en el fenotipo de resistencia y finalmente en la respuesta terapéutica. En esta línea, diferentes autores han demostrado la importancia de los transportadores de membrana, entre los que se incluyen los transportadores tipo ABC dependientes de ATP, como bombas importantes de

eflujo/influjo de los medicamentos (28–30). Por otro lado, las acuagliceroproteínas (AQP), han sido descritas como proteínas de membrana que pueden facilitar el ingreso de diferentes compuestos a la célula, entre los que resaltan los compuestos metaloides como el antimonio (31–33).

Estudios recientes mostraron que los transportadores tipo ABC, ABCC1 y ABCB1, pueden facilitar el eflujo de los antimoniales en los macrófagos desde el citoplasma, disminuyendo la concentración intracelular del antimonio y favoreciendo la supervivencia del parásito (29). La inhibición de dichos transportadores con lovastatina en modelos murinos logró incrementar la acumulación intracelular del antimonio favoreciendo la muerte intracelular del parásito y la sobrevivencia de los ratones, que de lo contrario sucumbían a la infección al día 180 de seguimiento (29). Otros estudios, validaron funcionalmente el papel desempeñado por el transportador ABCB6, localizado en la membrana fagolisosomal, como un transportador de antimonio desde el espacio citoplasmático al interior del fagolisosoma donde reside el parásito. Los macrófagos silenciados (ARN interferente) para el transportador ABCB6 favorecieron la supervivencia del parásito (28). Finalmente, ABCB5, localizado tanto en la membrana plasmática como en la membrana del fagolisosoma, se correlacionó positivamente con la supervivencia intracelular del parásito durante la exposición al antimonio. Los autores lo postularon como una posible bomba de eflujo del antimonio desde el fagolisosoma al citoplasma y del citoplasma al espacio extracelular (Figura 4) (30). Estos estudios han empezado a dilucidar la importancia que tienen los transportadores tipo ABC en el metabolismo y transporte del antimonio y su relación con la supervivencia del parásito.

Los transportadores ABC no son los únicos protagonistas, las proteínas AQP-3-7 y 9 son la puerta de entrada de los metaloides a la célula hospedera y su inducción se ha asociado con mayor acumulación del AS y Sb (Figura 4), incrementando la susceptibilidad de la célula a la toxicidad por dichos metales (31–33). No obstante, estos datos derivan de estudios con células cancerígenas y su papel en modelos de infección con *Leishmania* en macrófagos primarios expuestos al Sb^V no mostraron inducción de AQP9 (28).



4.3.3. Transporte, metabolismo y detoxificación de antileishmaniales en la célula hospedera: Miltefosine

El miltefosine (MLF) es la única opción terapéutica de uso oral. En un inicio el MLF era empleado como una droga anticancerígena que posteriormente fue aprobada para su uso en

el tratamiento de la leishmaniasis. La primera evidencia de un transportador implicado en el eflujo del MLF en la célula hospedadora proviene de modelos con células cancerígenas, donde se reportó que la sobreexpresión de ABCB1 confería resistencia frente al MLF (82). Posteriormente, otro estudio demostró el papel del transportador de membrana ABCA3 en el eflujo del MLF directamente en macrófagos infectados con *Leishmania*, donde el silenciamiento génico (ARN interferente) de este transportador en el macrófago incrementaba la acumulación intracelular de la droga y revertía parcialmente el fenotipo de una cepa de *Leishmania* resistente al MLF (81). Los transportadores ABC no son específicos de una sola molécula y se conoce que pueden conferir resistencia a diferentes compuestos. A pesar de esto, la resistencia cruzada entre MLF y antimonio no ha sido reportada aún, pero estudios independientes, uno con antimonio y otro con MLF, ha señalado al transportador ABCB1 como transportador común (29, 82), por lo que la resistencia cruzada entre MLF y antimonio podría ser factible. Es aquí donde el tratamiento y los regímenes terapéuticos cobran una mayor importancia.

4.4. Los biomarcadores como moléculas predictivas y pronósticas de respuesta terapéutica

Biomarcador: “Es una característica que es medible objetivamente y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, patológicos o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica”. Traducido del inglés: Biomarkers Definitions Working Group Bethesda, 2001 (39).

En el contexto de la *Leishmaniasis* diversos estudios se han enfocado en identificar biomarcadores directos -en los cuales se evalúa la presencia del parásito o alguno de sus componentes- o indirectos -donde se identifican moléculas del hospedero relacionadas con la enfermedad-, tanto para el diagnóstico, la respuesta a la terapia o la patogenicidad de la enfermedad (34).

Algunos reportes han tratado de relacionar la carga parasitaria en biopsias de pacientes con LC (*L. major* y *L. donovani*) con la respuesta terapéutica al MLF, encontrando una caída en la carga parasitaria de 1 log por cada semana de tratamiento (83). No obstante, esto fue sólo el reporte de caso de dos pacientes, por lo que la evidencia no deja de ser circunstancial. No obstante, la evaluación de la carga parasitaria como parámetro de respuesta al tratamiento

en pacientes con LV es el “Gold Standard”, pero su evaluación es invasiva requiriendo aspirado de bazo o de médula ósea para el monitoreo clínico (34, 84).

Otros estudios realizados en Brasil en el contexto de la leishmaniasis visceral (*L. infantum*), donde evaluaron diferentes antígenos solubles (sIL-2R, sCD8, sCD4, sICAM-1 y neopterina) en muestras de suero pre y post-tratamiento, en niños que curaron y fallaron a la terapia antimonial (n=10/por grupo). Mostrando que los antígenos solubles IL-2R e ICAM-1 pueden ser empleados como biomarcadores tempranos (antes de iniciar el tratamiento), predictores de desenlace. Mientras que el antígeno soluble CD8 y la neopterina como marcadores de seguimiento al tratamiento (85, 86). No obstante, dichos biomarcadores requieren estudios de validación adicionales debido al número bajo de pacientes incluidos y que las muestras pre-tratamiento se colectaron en diferentes momentos de evolución de la enfermedad. Otros biomarcadores inmunológicos se han medido en el suero de pacientes (IL-10, TNF α , IFN γ , etc.). Sin embargo, los resultados no son contundentes, incluso llegando a ser contradictorios en algunos casos (34, 87, 88). Por otra parte, estudios enfocados en patogenicidad y cronicidad de la enfermedad, identificaron la sobre-expresión de las quemoquinas CXCL3 y CXCL5 asociadas a la infección con cepas de *L. V. panamensis* provenientes de lesiones cutáneas crónicas (27). No obstante, la relación entre cronicidad de la enfermedad y falla terapéutica no ha sido establecida, pero se podría pensar que una cepa más patogénica que genera enfermedad crónica también tendría más probabilidades de generar falla terapéutica.

El estallido respiratorio es un mecanismo importante mediado por la célula hospedera para controlar la infección. No obstante, se ha observado que pacientes infectados con *L. V. braziliensis* que fallan al tratamiento antimonial presentan mayores niveles en plasma de la enzima súper óxido dismutasa 1 (SOD1), responsable de catalizar la dismutación del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, disminuyendo así los niveles de iones súper óxido y promoviendo la supervivencia del parásito (36).

Otros biomarcadores clínicos y biológicos descritos para LC como predictores de falla terapéutica o recaída son: el tiempo de evolución de la lesión cutánea ≤ 2 meses al momento de iniciar el tratamiento, el haber recibido terapia previa (37, 89) y tener prueba de Montenegro positiva (prueba intradérmica para evaluar la reactividad frente a los

antígenos de *Leishmania*) (37, 90). Sin embargo, otros estudios han indicado que entre más fuerte sea la reacción a la prueba de Montenegro, mayor será la probabilidad de curar (89), lo cual no contradice los hallazgos previos, dado que el paciente puede tener cura aparente, pero recaer después de la cura.

4.4.1. Nuevas tecnologías empleadas en la identificación de biomarcadores

Actualmente, la respuesta terapéutica en los pacientes con LC se define como la reepitelización total del tejido sin signos de inflamación a la semana 26 después de haber iniciado el tratamiento (17). De otro lado, la ausencia de amastigotes en aspirado de bazo o médula ósea es el parámetro de evaluación para el caso de la LV. No obstante, estos parámetros clínicos y parasitológicos son difíciles de medir y requieren personal especializado.

Otras limitaciones que presentan los parámetros clínicos para la definición de respuesta terapéutica son: 1) limita el uso de otras opciones terapéuticas o el cambio de tratamiento de forma temprana y oportuna a otra alternativa que podría ser más eficaz para el paciente, pues requeriré seguimiento durante 6 meses para establecer la respuesta clínica, 2) se expone al paciente a los efectos tóxicos de la droga, 3) dificulta el seguimiento del tratamiento de los pacientes que viven en zona rural dispersa y comunidades apartadas, que son la gran mayoría para el caso de la leishmaniasis, y 4) dificulta el diseño de ensayos clínicos para la evaluación de nuevas opciones terapéuticas dado los largos periodos de seguimiento para establecer la cura definitiva bajo los estándares actuales. Considerando lo anterior, la identificación de nuevos biomarcadores de respuesta terapéutica mucho más precisos, de fácil aplicación y que requieran menor tiempo de seguimiento son una necesidad insatisfecha para optimizar el tratamiento de los pacientes con leishmaniasis.

La llegada de las tecnologías de alto rendimiento como la secuenciación de nueva generación, la proteómica y la metabolómica, han facilitado el descubrimiento de nuevas moléculas para ser empleadas como biomarcadores. Sin embargo, el número de biomarcadores aprobados para uso clínico aún sigue siendo bajo, entre los cuales figuran biomarcadores genéticos o metabólicos empleados en cáncer para pronóstico, predicción o seguimiento del tratamiento (91). Por ejemplo, los niveles elevados de metabolitos relacionados con el metabolismo de la carnitina y el piruvato, junto con la medición de

enzimas claves que participan en el proceso (CAP1A y PDC), permitieron identificar vías metabólicas importantes relacionadas con el cáncer de próstata, con potencial uso en el diagnóstico y predicción de sobrevida en la población afectada (92). Adicionalmente, bajos niveles de ácidos grasos de cadena ultra larga fueron relacionados con la detección de cáncer de colon (93), y entre los biomarcadores genéticos más conocidos para predecir el riesgo de cáncer de mama, se encuentran las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 (94).

El uso de estas nuevas tecnologías en las enfermedades desatendidas como la leishmaniasis, brindarán la oportunidad de identificar nuevos biomarcadores más acordes a las necesidades de la población, mejorar el tiempo de respuesta y optimizar el tratamiento.

5. Declaración Ética

Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación con Sujetos Humanos de CIDEIM (código de aprobación CIEIH 02-2018) (Anexo 1), de acuerdo con las pautas nacionales e internacionales para la realización de estudios clínicos. Los datos empleados para los análisis contaron con la aprobación para su uso en futuros estudios de investigación por parte de los individuos involucrados en el proyecto marco “Metabolismo y Transporte de Drogas en Macrófagos Humanos y Desenlace Terapéutico al Tratamiento Antileishmanial” con código de aprobación del Comité de Ética número 1209. Los individuos reclutados participaron voluntariamente en el estudio y cada participante firmó el consentimiento informado.

6. Capítulo 1

Interferones tipo I median la respuesta pro-inflamatoria inicial en macrófagos de pacientes con leishmaniasis cutánea con cura terapéutica.

“Type I interferons mediate an early pro-inflammatory response in macrophages from therapeutically cured cutaneous leishmaniasis patients.”

Deninson Alejandro Vargas¹, Laura Dilon, Najib El-Sayed², María Adelaida Gómez¹

¹ Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, CIDEIM, Cali, Colombia.

² Center for Bioinformatics and Computational Biology, University of Maryland, College Park, Maryland, USA.

En preparación para someter a: **Plos One**

Hallazgos principales

- Los macrófagos obtenidos de pacientes que curaron al tratamiento antimonial presentaron una respuesta predominantemente pro-inflamatoria, mediada principalmente por los interferones tipo I.
- Los macrófagos aislados de pacientes que fallaron al tratamiento presentaron una respuesta anti-inflamatoria, mediada principalmente por la vía de señalización del TFG- β y procesos de cicatrización heridas.
- Las metalotioninas, proteínas implicadas en el transporte y homeostasis de iones zinc y cobre, y detoxificación de xenobióticos, fueron inhibidas en macrófagos de pacientes que fallaron al tratamiento antimonial.

6.1. Antecedentes

Estudios realizados en modelos murinos resistentes a la infección con cepas de *L. major*, demostraron que un perfil de respuesta T_H1 era curativo, promoviendo la secreción de IL-12 e IFN γ , activación de macrófagos, estallido respiratorio y secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF α e IL-6, entre otras (25). Por otro lado, los ratones susceptibles a

la infección presentaban un perfil de respuesta T_H2 , principalmente dominado por citoquinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-10 e IL-13, que conduce a la diseminación de la infección y no curación (25). No obstante, dicho paradigma no ha sido corroborado en el hospedero humano donde se observan perfiles mixtos T_H1/T_H2 indicando que la respuesta celular es más compleja (25, 95).

Estudios iniciales de expresión génica de macrófagos expuestos a la infección por *Leishmania* mostraron una inhibición global de la expresión génica durante las primeras horas, llevando a postular que la infección promovía un estado de no-respuesta en los macrófagos favoreciendo la replicación del parásito a nivel intracelular (96, 97). No obstante, estudios posteriores empleando microarreglos y ARNseq mostraron resultados contradictorios indicando que incluso en las primeras horas de infección había una fuerte modulación de la expresión génica en monocitos y macrófagos humanos (98–100).

El efecto que el antimonio ejerce sobre la expresión génica en la célula hospedera también ha sido evaluado, indicando que la droga *per se* tienen un efecto inmunomodulador (28, 101–103). La exposición a antimoniales induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8 y potencia el estallido respiratorio en pacientes con LC (104, 105). Los antimoniales también modulan la expresión de transportadores de membrana, así como enzimas implicadas en su metabolismo en la célula hospedera (28). Entre estos resaltan la sobre expresión de MT2A, ABCB6, SLC7A11, ABCC2, GSR y GSTM3 y la inhibición de AQP-1, ALOX-5, P-gp entre otros (28). Considerando lo anterior, exploramos como la interacción entre la droga-parásito-macrófago modulan los perfiles de expresión génica en células de pacientes que curaron o fallaron al tratamiento antimonial empleando perfilamiento transcriptómico global, a fin de identificar posibles mecanismos de la célula hospedera implicados en la modulación de la respuesta antileishmanial.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Diseño del estudio

Con el objetivo de identificar los posibles mecanismos moleculares relacionados con la supervivencia intracelular de *Leishmania* en el contexto de la respuesta terapéutica frente a

los antimoniales, evaluamos los perfiles transcriptómicos de macrófagos obtenidos de pacientes que curaron y fallaron al tratamiento.

6.2.2. Pacientes

Se reclutaron prospectivamente 6 pacientes con LC, 3 que curaron al tratamiento antimonial y 3 que fallaron (promedio 3 meses de evolución al momento de la toma de muestras). De estos pacientes se colectaron 50 mL de sangre periférica para la purificación posterior de CMSP empleando el gradiente de ficoll (Histopaque 1077-SIGMA), obtención de macrófagos y análisis de perfiles transcriptómicos empleando ARNseq.

6.2.3. Obtención de CMSP y diferenciación a macrófagos

Los CMSP de sangre periférica anticoagulada con heparina, se diferenciaron en una placa de cultivo de 6 pozos empleando medio RPMI 1640 (Gibco) sin suero durante 2h a una concentración de 1×10^6 monocitos/pozo, a 37°C, 5% CO₂. Posteriormente, todas las células no adheridas (principalmente linfocitos) fueron lavados de la placa con D-PBS (Gibco) y las células adheridas se colocaron a incubar nuevamente con medio RPMI, 10% Suero Fetal Bovino (SFB), 100 µg/mL de estreptomycin, 100 U/mL de penicilina durante 7 días, a 37°C, 5% CO₂ para permitir la diferenciación de los monocitos a macrófagos.

6.2.4. Infección y exposición al Sb^V

Trascurridos los 7 días los macrófagos se infectaron con *L. V. panamensis*. Los parásitos se opsonizaron con suero humano AB+ al 10% en RPMI durante 1h a 34°C 5% CO₂. Posteriormente se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI, 10% SFB, 100 µg/mL de estreptomycin, 100 U/mL de penicilina, se infectaron los macrófagos en una relación 10:1 (parásitos:macrófago) durante 2h a 34°C 5% CO₂ y los parásitos no fagocitados fueron lavados con D-PBS. Se dejó continuar el proceso de infección durante otras 24h a 34°C 5% CO₂. Finalmente, los macrófagos infectados fueron expuestos a 32 µg/mL de Sb^V, concentración máxima de antimonio alcanzada en plasma, durante otras 24h, a 34°C, 5% CO₂. Finalizadas las 24h, las células fueron colectadas empleando Trizol (ambion) para la extracción y purificación del ARN total siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6.2.5. Perfiles transcriptómicos-ARNseq

Se obtuvo ARN de alta pureza de los macrófagos primarios infectados con *Leishmania V. panamensis* y expuestos a 32 µg/mL de Sb^V. La calidad del ARN se verificó en un Agilent Bioanalyzer 2100. Se construyeron las librerías de cADN enriqueciendo el ARN con perlas de poly_TTT y la síntesis empleando los reactivos de TruSeq Stranded mRNA Library Prep (Illumina). Se realizó secuenciación de nueva generación con tecnología Illumina (HiSeq™ 1500). Se revisó la calidad de las secuencias y se ensamblaron de acuerdo con los procesos establecidos en el laboratorio del Dr. Najib El-Sayed (<https://github.com/elsayed-lab/hpgltools>). En resumen, se usó Trimmomatic (106) para remover las secuencias adaptadoras restantes y las secuencias flanqueantes cuando el puntaje de calidad estaba por debajo del umbral de 20. Los parámetros de calidad de la secuencia se evaluaron usando FastQC. Las alineaciones fueron hechas con TopHat (v 2.0.10) (107). Los genes que tenían menos de 1 lectura por millón en n muestras (donde n es el tamaño del grupo más pequeño de réplicas (108), fueron removidos antes del análisis de expresión diferencial. Se aplicó un esquema de normalización por cuantil a todas las muestras (109) y los datos se transformaron empleando Log₂. Se empleó el análisis de componentes principales para evaluar las réplicas biológicas y para visualizar la relación entre las muestras. Se usó el paquete Limma (linear models for microarray data) para el análisis de expresión diferencial posterior a la aplicación del paquete voom para transformar (110). Las comparaciones entre los grupos se realizaron en Limma para identificar los genes diferencialmente expresados, en relación con el desenlace terapéutico. Los valores $p < 0.05$ se ajustaron con la prueba de comparaciones múltiples Benjamini–Hochberg en combinación con el logaritmo del nivel de expresión génica ≥ 1 (genes sobre-expresados) o ≤ -1 (genes inhibidos).

Se usó STRING 10 (111) para los análisis de vías y redes de proteínas enriquecidas en los grupos de interés. Previo a esto, la base de datos de expresión génica fue depurada eliminando todos aquellos ARN detectados que no codificaran para una proteína previamente descrita e identificada (marcos de lectura abiertos, pseudo-genes y ARNs no codificantes). Para cada análisis, los genes sobre-expresados e inhibidos se considerarán por separado. Las categorías enriquecidas de ontología genética también se identificaron usando STRING 10.

6.3. Resultados

6.3.1. Los macrófagos primarios obtenidos de los pacientes que presentaron cura o falla terapéutica, evidenciaron perfiles transcriptómicos divergentes durante la infección y la exposición al Sb^V.

Los perfiles transcriptómicos obtenidos de los macrófagos aislados de los pacientes que curaron (n=3) y fallaron al tratamiento antimonial (n=3), mostraron un total de 2358 genes diferencialmente modulados sumando ambos grupos (t-test pareado $p \leq 0.05$), curas y fallas, de los cuales 1061 genes fueron diferencialmente modulados en los macrófagos obtenidos de las curas y 1297 en los macrófagos obtenidos de las fallas (Anexo 2). Se empleó el análisis de componentes principales (PCA) como método de análisis multivariado para reducir la complejidad de la información y evaluar la capacidad los perfiles transcriptómicos obtenidos de separar los grupos interés. Para esto, se emplearon todos los genes significativamente modulados en ambos grupos (2358 genes), obteniéndose un porcentaje de varianza en el componente 1 (PC1) del 82.72% y el PC2 del 8.83%, para un total del 91.5% de varianza explicada por el modelo. Los análisis mostraron una separación clara de los grupos, donde el grupo de macrófagos obtenidos de las curas expuestos a la infección por *L. V. panamensis* y al Sb^V (Lp.+Sb^V) formó un clúster aparte de los macrófagos obtenidos de las fallas, separados tanto por el componente 1, como por el componente 2 (Figura 5). Estos resultados corroboran el potencial que tienen los perfiles transcriptómicos para caracterizar la repuesta del hospedero durante el tratamiento antimonial, permitiendo profundizar en el entendimiento de los mecanismos moleculares de la célula hospedera que controlan la infección y su interacción con la droga, así como el papel que desempeña la célula hospedera durante la respuesta clínica.

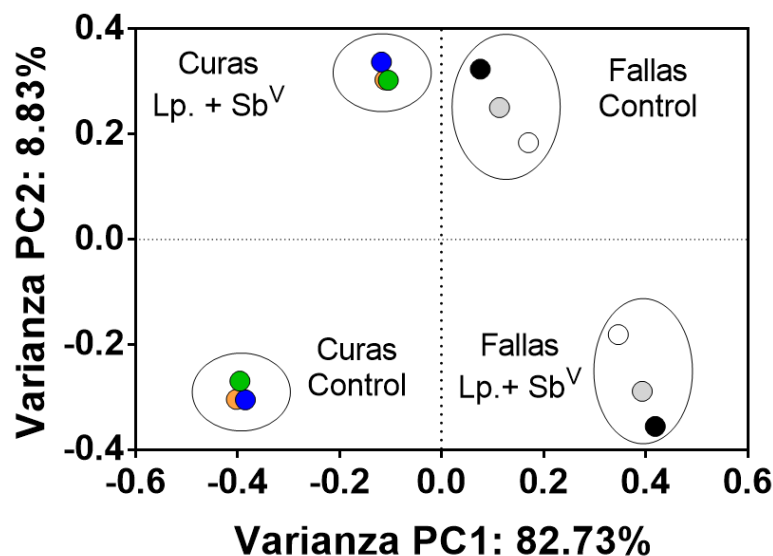


Figura 5. Los perfiles transcriptómicos evidenciaron una respuesta diferencial de los macrófagos aislados de pacientes con divergente respuesta terapéutica.

Los controles representan los macrófagos primarios de los pacientes sin droga e infección. Cada círculo identificado con un color diferente representa una muestra independiente. Se empleó un n=3/grupo. Lp.: *Leishmania panamensis*, Sb^V: antimonio pentavalente.

6.3.2. Los macrófagos aislados de pacientes que curaron presentaron una fuerte modulación génica relacionada con procesos pro-inflamatorios, contrario a lo que ocurre en los macrófagos aislados de las fallas donde predominan los procesos de reparación celular y anti-inflamatorios.

Los genes diferencialmente modulados en los macrófagos obtenidos de los pacientes se agruparon en categorías de ontología génica de acuerdo con su nivel de expresión (sobre-expresados o inhibidos) y su grupo clínico de procedencia (curas o fallas) (Tabla 2). Se encontró que las principales categorías inducidas en los macrófagos de los pacientes que curaron estaban estrechamente relacionadas con procesos inmunológicos (Tabla 2), tales como: respuesta inmune, vía de señalización de citoquinas, respuesta a virus y vía de señalización de interferones tipo I. Por el contrario, en los macrófagos de pacientes con falla, las principales categorías moduladas se asociaban con procesos adhesión celular, regulación de la localización, regulación de la angiogénesis y endocitosis entre otras (Tabla 2). La única categoría significativamente inhibida en los macrófagos de los pacientes con

falla terapéutica fue la relacionada con la respuesta celular a metales, mediada principalmente por las metalotioninas, familia de proteínas estrechamente relacionada con la unión, metabolismo y detoxificación de metales. No se presentaron categorías de ontología génica significativamente inhibidas en los macrófagos obtenidos de los pacientes que curaron (Tabla 2), a pesar de haberse encontrado 40 genes inhibidos (Anexo 2).

La fuerte inducción de mecanismos relacionados con una respuesta inmune pro-inflamatoria en los macrófagos obtenidos de los pacientes que curaron, contrario a la inducción de los procesos angiogénicos y de reparación encontrados en los macrófagos obtenidos de los pacientes que fallaron bajo las mismas condiciones experimentales, nos llevan a postular que una respuesta pro-inflamatoria en las fases tempranas de infección es necesaria para favorecer la eliminación del parásito y posterior cura clínica.

6.3.3. El factor de transcripción JUN fue identificado como el nodo principal de interacción entre los clústeres de histonas, vía de señalización de interferones tipo I y receptores acoplados a proteínas G en los macrófagos obtenidos de las curas.

Complementario a los análisis de ontología génica, se realizaron análisis de redes de proteínas con los genes significativamente modulados. La ontología génica muestra las categorías generales de agrupación de genes. Sin embargo, allí no es posible evidenciar como las proteínas codificadas por estos genes interactúan entre ellas y con otros posibles clúster de proteínas no relacionados directamente.

Tabla 2. Categorías principales de ontología génica enriquecidas en los macrófagos primarios aislados de pacientes con divergente respuesta terapéutica.

Genes inducidos en los macrófagos obtenidos del grupo de las curas				Genes inducidos en los macrófagos obtenidos del grupo de las fallas			
# ID ontología génica	Categoría	# genes observados	FDR*	# ID ontología génica	Categoría	# genes observados	FDR*
GO.0006955	respuesta inmune	124	1.76E-13	GO.0007155	adhesión celular	98	2.85E-07
GO.0002376	procesos del sistema inmune	159	3.41E-12	GO.0032879	regulación de la localización	179	1.39E-06
GO.0019221	vía de señalización mediada por citoquinas	56	5.48E-12	GO.0002376	procesos del sistema inmune	154	5.75E-05
GO.0006952	respuesta de defensa	124	7.55E-12	GO.0051270	regulación de los componentes celulares del movimiento	72	9.91E-05
GO.0009607	respuesta a estímulos bióticos	78	1.57E-11	GO.0030154	diferenciación celular	216	0.000117
GO.0051707	respuesta a otros organismos	76	1.57E-11	GO.0030334	regulación de la migración celular	63	0.000117
GO.0060337	vía de señalización interferones tipo I	23	1.57E-11	GO.0048869	procesos de desarrollo celular	225	0.000117
GO.0071357	respuesta celular a los interferones tipo I	23	1.57E-11	GO.0006897	endocitosis	55	0.000145
GO.0045087	respuesta inmune innata	93	2.06E-11	GO.0001503	osificación	35	0.000193
GO.0051607	respuesta de defensa a virus	33	6.13E-11	GO.0040011	locomoción	101	0.000194
Genes inhibidos en los macrófagos obtenidos del grupo de las curas				Genes inhibidos en los macrófagos obtenidos del grupo de las fallas			
No se encontraron categorías significativamente inhibidas [#]				GO.0071294	respuesta celular a los iones zinc	5	2.2x10 ⁻⁵
				GO.0071276	respuesta celular a los iones cadmio	4	0.00108

* FDR: tasa de descubrimientos falsos < 0.05. Sólo se muestran las primeras 10 categorías con los valores p más significativos cuando aplica.

Estos análisis de redes de proteínas permitieron evidenciar la presencia de tres clústeres principales en el grupo de los genes sobre-expresados, los cuales se encontraron estrechamente interconectados por el factor de transcripción JUN (Figura 6).

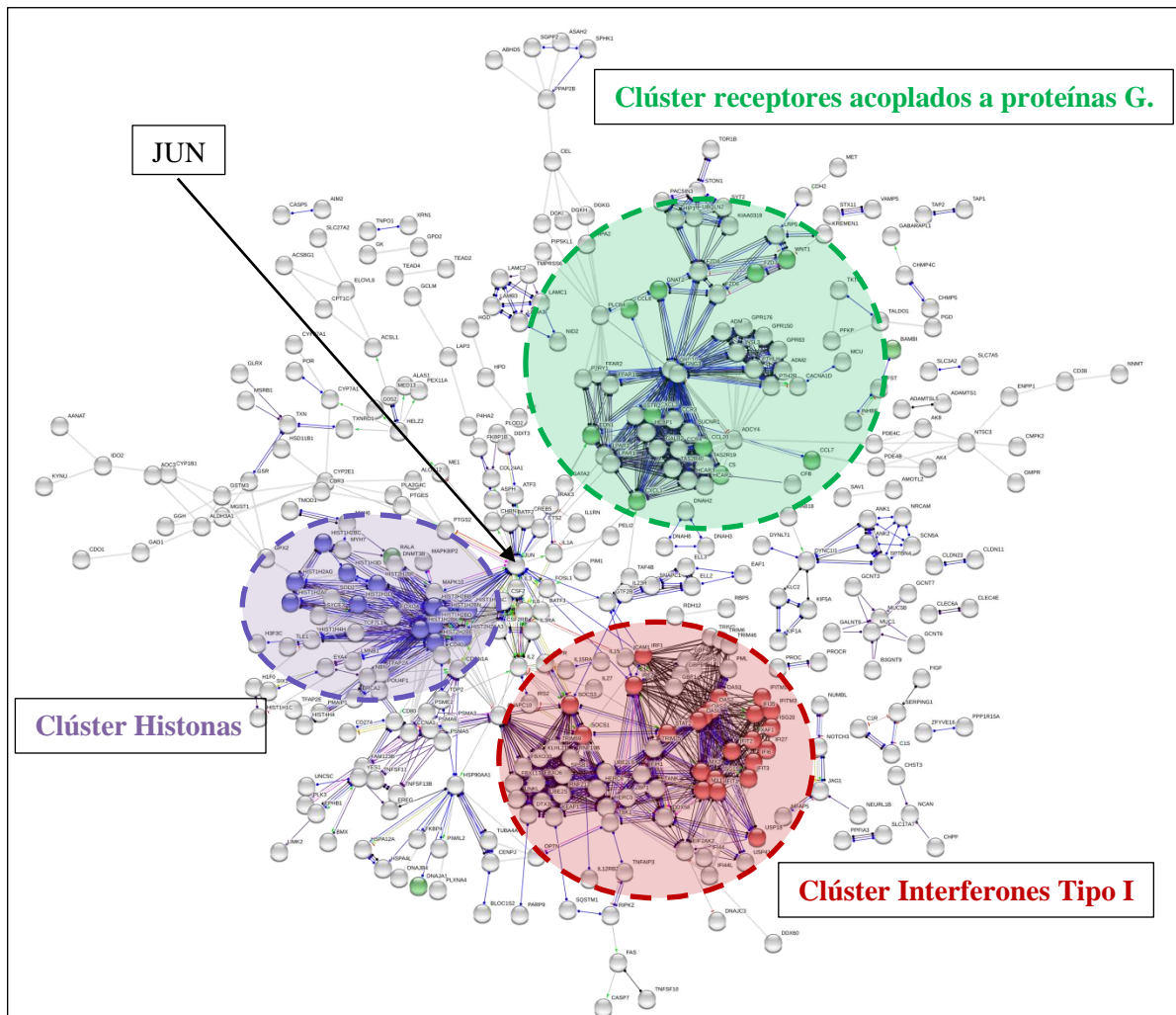


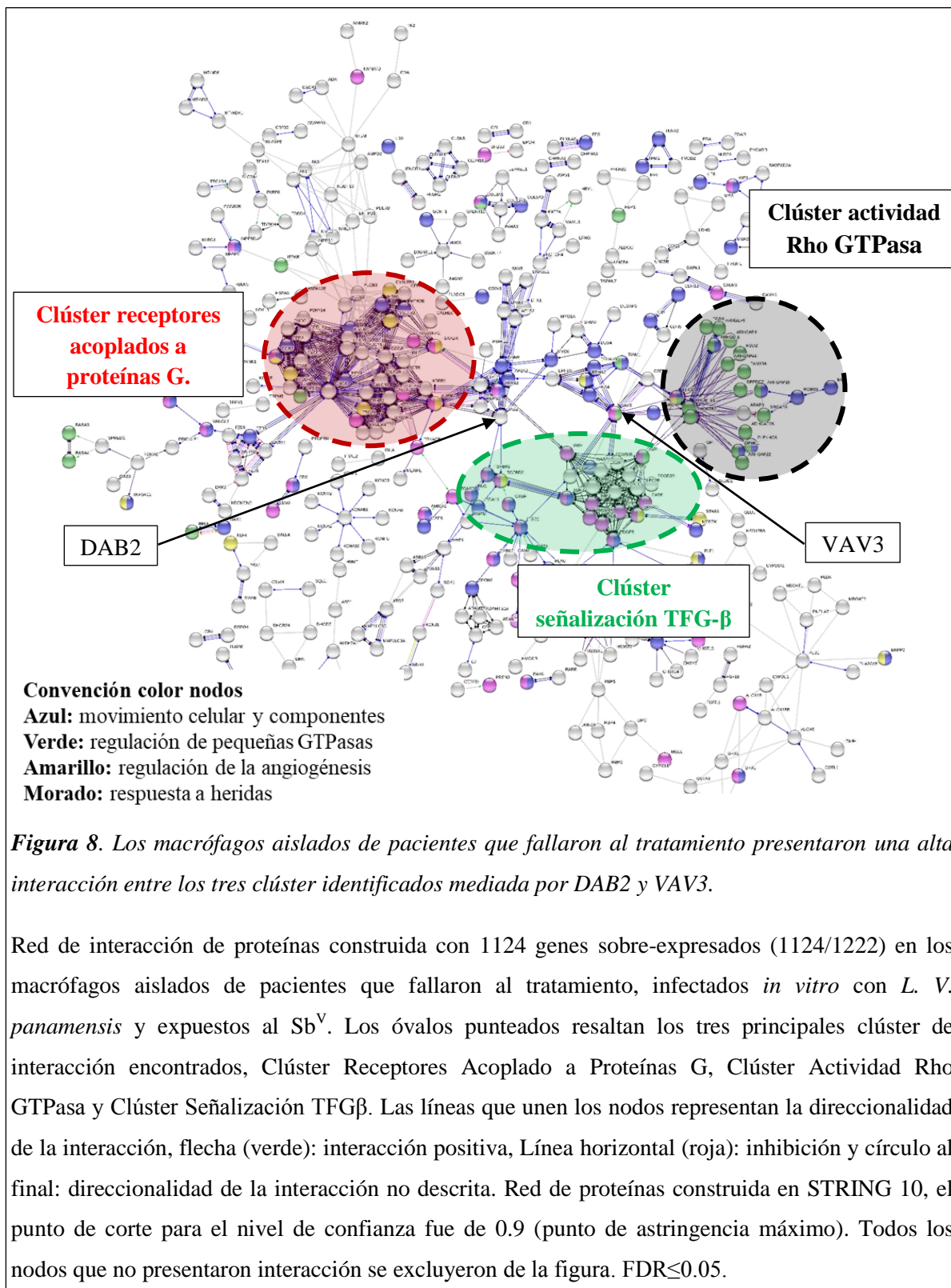
Figura 6. Los macrófagos aislados de pacientes que curaron presentan una alta interacción de proteínas relacionadas con la respuesta inmune innata mediada por los interferones tipo I y vías de señalización celular acopladas a proteínas G.

Red de interacción de proteínas construida con 943 genes sobre-expresados (943/1021) en los macrófagos aislados de pacientes que curaron al tratamiento, infectados *in vitro* con *L. V. panamensis* y expuestos al Sb^V. Los óvalos punteados resaltan los tres clúster principales de interacción encontrados, Clúster Interferones Tipo I (rojo), Clúster Histonas (morado) y Clúster Receptores Acoplados a Proteínas G (verde). Las líneas que unen los nodos representan la direccionalidad de la interacción, flecha (verde): interacción positiva, Línea horizontal (roja): inhibición y círculo al final: direccionalidad de la interacción no establecida. Red de proteínas construida en STRING 10, el punto de corte para el nivel de confianza fue de 0.9 (punto de astringencia máximo). Todos los nodos que no presentaron interacción se excluyeron de la figura. $FDR \leq 0.05$.

Figura 7. Ampliación de los tres clúster principales identificados en los macrófagos aislados de pacientes que curaron: Interferones Tipo I, Histonas y vías de señalización dependientes de proteínas G.

A) Clúster de proteínas implicadas en las vías de señalización de los interferones tipo I (círculos rojos). **B)** Clúster de histonas (círculos morados). **C)** Clúster de receptores acoplados a proteínas G (círculos verdes). Las líneas que unen los nodos representan la direccionalidad de la interacción, flecha (verde): interacción positiva, Línea horizontal (roja): inhibición y círculo al final: direccionalidad de la interacción no establecida. Red de proteínas construida en STRING 10, el punto de corte para el nivel de confianza fue de 0.9 (punto de astringencia máximo). Todos los nodos que no presentaron interacción se excluyeron de la figura. $FDR \leq 0.05$.

Para el caso de los genes sobre-expresados en los macrófagos de las fallas, se evidenció el predominio de una respuesta anti-inflamatoria con una fuerte interacción de tres clúster principales (Figura 8) y estrechamente interconectados por dos nodos: DAB2 y VAV3 (Figura 8). El nodo DAB2, el cual conecta de manera directa el clúster TFG β con el clúster receptores de membrana y de manera indirecta el clúster Rho GTPasa, está implicado en la señalización de diferentes receptores de membrana, incluida la señalización a través de los receptores TFG- β (112, 113). El nodo VAV3, el cual conecta de manera directa los clúster Rho GTPasa-TFG- β , y de manera indirecta con el clúster receptores de membrana, actúa como un factor de intercambio para las proteínas de unión a GTP y juega un papel importante en la angiogénesis y migración de las células endoteliales necesaria para una apropiada cicatrización de las heridas (114). En la Figura 9 se muestra una ampliación de cada uno de estos tres clúster, clúster de receptores acoplados a proteínas G (Figura 9A), Rho GTPasa (Figura 9B) y TFG- β (Figura 9C).



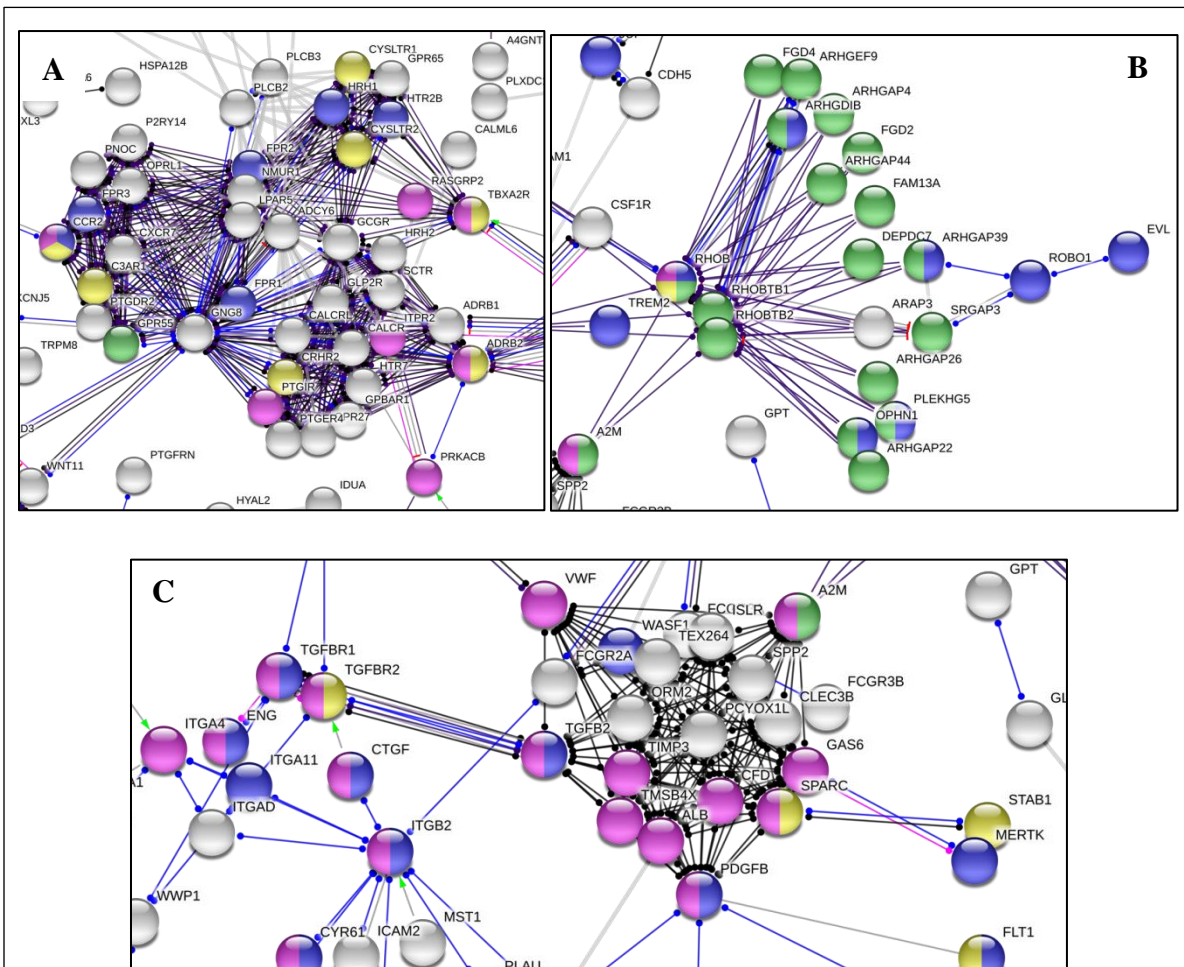


Figura 9. Amplificación de los clúster encontrados en los macrófagos aislados de pacientes que fallaron al tratamiento: clúster receptores de membrana acoplados a proteínas G, RhoGTPasa y señalización vía TFGβ.

A) Clúster de proteínas implicadas en las vías de señalización mediada por receptores acoplados a proteínas G. **B)** Clúster de actividad Rho GTPasa. **C)** Clúster de señalización TFGβ. Las líneas que unen los nodos representan la direccionalidad de la interacción, flecha (verde): interacción positiva, Línea horizontal (roja): inhibición y círculo al final: direccionalidad de la interacción no descrita. Red de proteínas construida en STRING 10, el punto de corte para el nivel de confianza fue de 0.9 (punto de astringencia máximo). Todos los nodos que no presentaron interacción se excluyeron de la figura. $FDR \leq 0.05$.

6.4. Discusión

Estudios previos de expresión génica realizados en macrófagos murinos, mostraron que la infección por *Leishmania* induce un estado de anergia en la célula hospedera durante las primeras horas de infección (96, 97). No obstante, dichos hallazgos fueron contrastados posteriormente donde se evidenció que los macrófagos tenían perfiles de polarización diferentes más que un estado de anergia *per se* (98, 99, 115). Algunos tendían a una repuesta más pro-inflamatoria, y otros hacia una respuesta anti-inflamatoria (116–118). Los datos presentados en este estudio van en línea con esta nueva idea de perfiles de polarización funcional diferentes en los macrófagos, encontrándose que los macrófagos aislados de pacientes que curaron al tratamiento antimonial, mostraron predominantemente un perfil pro-inflamatorio. En contraste, los macrófagos aislados de los pacientes que fallaron mostraron un perfil más anti-inflamatorio, de regulación y crecimiento celular.

Entre los perfiles de activación más destacados, resalta el clúster de señalización de los interferones tipo I encontrado en el grupo de las células derivadas de pacientes con curas. Esta vía de señalización se ha reportado como relevante durante la infección de células dendríticas humanas y macrófagos murinos infectados con *L. major*, encontrándose sobreexpresión de los genes IFIT5, IRF1, IRF7 y STAT2, entre otros, generando una respuesta protectora frente a la infección, relacionada con una mayor expresión de INOS y NOS2 y mayor secreción de IFN γ e IL-12 (119–121), potenciando una respuesta inmune celular tipo T_H1. No obstante, este perfil de activación fue especie-específico, pues la infección con *L. donovani* no generó la misma respuesta (122). Nuestros datos sugieren una fuerte respuesta de los interferones tipo I en los macrófagos primarios de pacientes que curaron al tratamiento infectados con *L. V. panamensis*, sin embargo, su papel durante la infección aún está por establecerse. Se ha demostrado que la expresión de los interferones tipo I en las etapas tempranas de la infección con su posterior inhibición, promueven una fuerte expresión subsecuente de los interferones tipo II (IFN γ) con la posterior eliminación del parásito gracias a la activación de células de la respuesta inmune como los macrófagos. En contra posición, cuando la expresión de los interferones tipo I se da de manera sostenida en el tiempo favorece la supervivencia del parásito, pues inhibe la inducción del pico de IFN γ (123). Los datos de este estudio muestran una fuerte inducción temprana de los interferones tipo I en los macrófagos de los pacientes que curaron al tratamiento, sin embargo, como la

medición realizada fue de un solo punto no se puede estimar su caída posterior con inducción del IFN γ . No obstante, y considerando que estos pacientes curaron al tratamiento antimonial, hipotetizamos que esta respuesta inicial de interferones tipo I seguida de la inducción de IFN γ es un evento probable que merece ser estudiado en profundidad.

Otro clúster de interés identificado en los macrófagos obtenidos del grupo de las células derivadas de pacientes con cura es el clúster de histonas, estas han sido implicadas en la respuesta pro-inflamatoria participando en la activación de los receptores tipo Toll y el inflamosoma, vías importantes en la activación y secreción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 β e IL-18 (124). Adicionalmente las histonas también pueden ejercer un efecto microbicida directo, actuando como péptidos antimicrobianos y antileishmaniales (125). Por lo tanto, estos resultados sugieren que una respuesta pro-inflamatoria inicial acompañada de la expresión y secreción de histonas puede ser determinante en el control de la infección y la respuesta terapéutica final. Esto contrasta, la respuesta observada en los macrófagos obtenidos de los pacientes que fallaron presentaron unos perfiles de expresión génica más relacionados con la migración, replicación y reparación celular. Se resaltan tres clústeres principales, el clúster TFG- β , relacionado con la inhibición de la respuesta inmune pro-inflamatoria y el favorecimiento de la replicación del parásito al bloquear la secreción de IFN γ e IL-12, citoquinas esenciales para la activación de los macrófagos y el establecimiento de una respuesta inmune celular (126). La señalización a través de los receptores para TFG- β también se asocia con procesos de reparación, angiogénesis y cicatrización de heridas y de manera paralela esta señalización se realiza a través de las proteínas Rho GTPasas (127–129), también inducidas en los macrófagos de los pacientes con falla terapéutica. Para resaltar, dos proteínas que ejercen como nodos centrales que se encargan de interconectar estos tres clústeres son VAV3 y DAB2. VAV3 juega un papel clave en los procesos angiogénicos y es un factor necesario en los procesos de cicatrización de heridas (114) y DAB2 participa en la endocitosis mediada por clatrina y está implicado en la señalización a través de TFG- β (112). Esta respuesta inicial podría estar favoreciendo el establecimiento de la infección por *Leishmania* y la posterior falla al tratamiento.

La única categoría de ontología génica que se encontró inhibida significativamente en el grupo de las fallas, fue la respuesta celular a iones zinc, conformada principalmente por las

metalotioninas, proteínas cuya función principal es la homeostasis de los iones zinc y cobre en la célula, pero también pueden participar en la detoxificación de otros metales pesados como el antimonio (130). Su papel en la infección por *Leishmania* durante la exposición al Sb^{V} aún no ha sido determinado y se discutirá con mayor profundidad en el capítulo 2.

7. Capítulo 2

Las metalotioneínas del hospedero participan en la actividad antileishmanial de los antimoniales

“Host metallothioneins participate in the antileishmanial activity of antimonials”

Deninson Alejandro Vargas¹, David Gregory², Rony Koren³, Dan Zilberstein³, María Adelaida Gómez¹

¹ Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, CIDEIM, Carrera 125 No. 19 – 225 Cali, Colombia.

² Pediatric Infectious Disease, Massachusetts General Hospital, Charlestown, MA, 02129

³ Technion Israel Institute of Technology, Faculty of Biology, 32000 Haifa, Israel

Sometido a: **The Journal of Biological Chemistry**

Hallazgos principales

- El silenciamiento génico de las metalotioneínas (MT) mediado por shARN dirigido a estos transcritos se pierde por la fuerte modulación de la expresión de metalotioninas durante condiciones de estrés.
- El silenciamiento del factor de transcripción MTF-1, principal factor regulador de la expresión de las metalotioneínas en la célula, mantiene reprimida la expresión de las metalotioninas bajo condiciones de estrés por metales.
- La inhibición de expresión de MTs mediado por el silenciamiento génico de MTF-1, favoreció la supervivencia intracelular de *Leishmania V. panamensis* en macrófagos de la línea celular THP-1.

7.1. Antecedentes

El éxito o fracaso del tratamiento antileishmanial es multifactorial y el fenotipo de susceptibilidad del parásito no siempre explica la respuesta terapéutica (28, 131, 132). La exposición a metales de transición como el Sb^V, induce una respuesta de estrés en el hospedero que conducen a la activación de mecanismos compensatorios para la

detoxificación de metales/xenobióticos y contrarrestar la toxicidad inducida por la droga (133–136). Por lo tanto, los factores del hospedero que median en este tipo de respuesta de estrés frente al Sb^{V} , podrían tener un papel clave en la biodisponibilidad del fármaco dentro de las células y por ende en la exposición intracelular del parásito a la droga, lo que en última instancia influirá en la respuesta frente al tratamiento antileishmanial.

Adicional al papel desempeñado por los transportadores tipo ABC en la célula hospedera (28–30, 66, 67, 70, 137), se encontró que otras proteínas relacionadas con la respuesta de estrés a metales se encuentran moduladas tras la exposición al Sb^{V} (28, 30). Entre estas proteínas se encuentran las metalotioneínas (MT), pequeñas proteínas citoplásmicas ricas en residuos de cisteína involucradas en la homeostasis del zinc, detoxificación de metales y moléculas electrofílicas como las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (NO) (130, 138–142). Hay cuatro familias de MT (MT1-4), de las cuales MT1 y MT2 se expresan de manera ubicua, mientras que MT3 y MT4 se encuentran principalmente en el sistema nervioso central y en el epitelio escamoso estratificado, respectivamente (140, 143). Además de su función biológica central en la homeostasis de zinc (y en menor medida de cobre), las MT se pueden unir a otros metales tóxicos con una alta afinidad, como el Cd, Hg, Pd, Ag, As y Sb (130), permitiendo a la célula tener una mayor tolerancia frente a la toxicidad de estos metales y facilitando su posterior detoxificación (141, 143, 144). Esta capacidad funcional y eficiencia en la eliminación de metales resulta de su alto contenido de residuos de cisteína con grupos tiol funcionales que le permiten unir metales y de la estricta regulación de su expresión génica, que puede aumentar hasta más de 100 veces bajo condiciones de estrés por metales alcanzando concentraciones intracelulares del orden de milimolar (140, 143, 145).

Nuestro grupo y otros han proporcionado evidencia indirecta del papel putativo que desempeñan las MT en la muerte intracelular de *Leishmania* mediada por Sb: 1) al igual que el Sb, la infección por *Leishmania* puede inducir fuertemente la expresión génica de las MT en macrófagos humanos (28, 100, 146); 2) se reportó una correlación inversa entre la expresión génica de MT2-A y la supervivencia intracelular de *Leishmania* durante la exposición al Sb^{V} (28) y 3) Las cepas de *L. V. panamensis* susceptibles al Sb inducen una mayor expresión de MT2-A en los macrófagos en comparación con las cepas resistente

(137). Finalmente, en este estudio buscamos validar funcionalmente el papel de las MT en la muerte intracelular de *Leishmania* mediada por el Sb^V.

7.2. Materiales y métodos

7.2.1. Reactivos

El antimonio de meglumina (Sb^V) sin aditivos (Walter Reed 214975AK, lote n° BLO918690-278-1A1W601) fue donado por el Walter Reed Army Institute, Silver Spring, MD, EE. UU. El 13-acetato de forbol-12-miristato (PMA) se adquirió en Sigma-Aldrich y el dihidrato de acetato de zinc de J.T. Baker.

7.2.2. Cultivo celular y diferenciación de las células THP-1

La línea celular de monocitos humanos THP-1 y las líneas silenciadas derivadas de esta se mantuvieron en cultivo a 1×10^6 células/mL en RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de SFB (Gibco), 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, a 37°C y 5% de CO₂. La puromicina a 5 mg/mL fue empleada solo para la selección y mantenimiento de las líneas celulares silenciadas. Los monocitos se diferenciaron a macrófagos con 250 ng/mL de PMA durante 3h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se lavaron dos veces con D-PBS (Gibco) y se cultivaron durante 24h en una placa para cultivo de 6 pozos a 37°C, 5% de CO₂ previo a la infección con *Leishmania*.

7.2.3. Cultivo de parásitos, infección y ensayos de supervivencia intracelular

Los promastigotes de *Leishmania Viannia panamensis* (MHOM/CO/2002/3594) se mantuvieron a 25°C en RPMI suplementado con 10% de SFB, 100 µg/mL de estreptomicina y 100 U/mL de penicilina. Las células THP-1 diferenciadas se infectaron con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento (día 6), previa opsonización con suero humano AB+ para promover su fagocitosis, en una relación 10:1 (parásito:macrófago) durante 2h. Luego los parásitos no fagocitados se lavaron con D-PBS dos veces y la placa de cultivo se incubó nuevamente 24 h a 34°C, 5% de CO₂. Después de establecida la infección, las células se expusieron durante 48 h al Sb^V (8, 16 y 32 µg/mL), o se dejaron sin tratamiento como control. La supervivencia intracelular del parásito se evaluó mediante RT-qPCR (PCR en tiempo real) empleando como blanco molecular el gen

del 7SLARN de *Leishmania* tal como se describió previamente (147). Los cebadores utilizados en las PCRs en tiempo real se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Cebadores empelados para las PCRs en tiempo real (RT-qPCR).

Nombre del primer	Secuencia nucleotídica de los primers 5'-->3'	Gen	Fluoróforo
GAPDH	Hs99999905_m1*	GAPDH	FAM
MT2-A	Hs01591333_g1*	MT2-A	FAM
MT1-E_F	GCATCCCCCTTTGCTCGAAAT	MT1-E	SYBR Green
MT1-E_R	CAGCTGCACTTCTCCGATG		SYBR Green
MT1-F_F	CCCCCTCCCCTGACTATCAA	MT1-F	SYBR Green
MT1-F_R	AGGAGCAGCAGCTCTTCTTG		SYBR Green
MT1-X_F	CTGCTTCTCCTTGCCCTCGAA	MT1-X	SYBR Green
MT1-X_R	TGTCTGACGTCCCTTTGCAG		SYBR Green
MTF-1_F	GCCATTTGAGTGTGACGTGC	MTF-1	SYBR Green
MTF-1_R	CATCGTGATCGCACCGAAAT		SYBR Green
TATA_F	CACGAACCACGGCACTGATT	TBP	SYBR Green
TATA_R	TTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC		SYBR Green
7SLARN_F	TGCTCTGTAACTTCGGGGGCT	Leishmania 7SLARN	SYBR Green
7SLARN_R	GGCTGCTCCGTYNCCGGCCTGACCC		SYBR Green

* Primers comprados a Invitrogen cuya secuencia no es revelada por derechos de patente.

TBP: TATA binding protein. GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. MT: metalotioninas. MTF-1: Metal transcription factor 1, por sus siglas en inglés respectivamente.

7.2.4. Fabricación de los ARN cortos en horquilla (shARN) para el silenciamiento génico

Se empleó un sistema basado en lentivirus para el silenciamiento génico constitutivo en células THP-1 mediado por el shARN (ARN interferente), tal como se describió anteriormente (148). Brevemente, se emplearon al menos dos shARN independientes para el silenciamiento génico de los genes candidatos (Tabla 4). Estos shARN se clonaron en el vector pLKO.1-TCR (Addgene, Cambridge, MA, EE. UU.); el mismo vector sin el shARN

se usó como un control de transducción (Control). Las partículas lentivirales fueron generadas por co-transfección de los plásmidos pLKO.1-TCR, psPAX2 y MD2.G (Addgene) en las células HEK-293T (ATCC). FuGENE HD (Roche) se utilizó como reactivo de transfección. El sobrenadante del cultivo celular con las partículas lentivirus se recogió 4 días después de la transfección y posteriormente se usó para transducir la línea celular monocitos THP-1 en medio RPMI con 10 mg/mL de polibreno. La transducción se realizó en una dilución de 1:1 (lentivirus:células THP-1). Las células transduccidas se seleccionaron bajo presión con puromicina (5 mg/mL) durante un mínimo de 5 días. El silenciamiento génico fue confirmado por RT-qPCR empleando como fluoróforo el agente intercalante SYBR green (Applied Biosystems) o las sondas de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems), tabla 3. La transducción de shARN fue confirmada por secuenciación de ADN.

Tabla 4. *shARN* empleados para silenciar los genes de interés.

Nombre de los shARN*	Secuencia nucleotídica de los oligos 5'-->3' (shARN)	Gen Silenciado
MT2-A_Top1	CCGGCTGCAAATGCAAAGAGTGCAACTCGAGTTGCACTCTTTGCATTTGCAGTTTTTTG	MT2-A ^{KD}
MT2-A_Bot1	AATTCAAAAAACTGCAAATGCAAATCGTGCAACTCGAGTTGCACTCTTTGCATTTGCAG	
MT2-A_Top2	CCGGGCAAAGAGTGCAAATGCACTTCTCGAGAAGTGCAATTTGCACTCTTTGCTTTTTTG	
MT2-A_Bot2	AATTCAAAAAAGCAAAGAGTGCAAATGCACTTCTCGAGAAGTGCAATTTGCACTCTTTGC	
MT_Tandem_Top1	CCGGTGCAAAGAGTGCAAATGCACCCTCGAGGGTGCAATTTGCACTCTTTGCATTTTTG	MT-tándem ^{KD} (MT1 y MT2-A)
MT_Tandem_Bot1	AATTCAAAAAATGCAAAGAGTGCAAATGCACCCTCGAGGGTGCAATTTGCACTCTTTGCA	
MT_Tandem_Top2	CCGGAATGCACCTCCTGCAAGAACTCGAGTTTCTTGCAAGAGGTGCATTTTTTTG	
MT_Tandem_Bot2	AATTCAAAAAAATGCACCTCCTGCAAGAACTCGAGTTTCTTGCAAGAGGTGCATT	
MTF-1_Top1	CCGGCAGAACTTACAATGGATATTACTCGAGTAATATCCATTGTAAGTTCTGTTTTTTG	MTF-1 ^{KD}
MTF-1_Bot1	AATTCAAAAAACAGAACTTACAATGGATATTACTCGAGTAATATCCATTGTAAGTTCTG	
MTF-1_Top2	CCGGCTCACCAGATCAGATTCATTTCTCGAGAAATGAATCTGATCTGGTGAGTTTTTTG	
MTF-1_Bot2	AATTCAAAAAACTCACCAGATCAGATTCATTTCTCGAGAAATGAATCTGATCTGGTGAG	

* Las parejas de oligos están identificados con un nombre genérico, que coincide en algunos casos con el nombre del gen, seguido la palabra Top (arriba) o Bot (abajo) y finalizada con un número que identifica las parejas. Ej: nombre_Top1 y nombre_Bot1, cuyos oligos son parejas complementarias.

7.2.5. Ensayos de citotoxicidad celular

Las células THP-1 y las líneas celulares silenciadas con el shARN se expusieron a concentraciones crecientes de Sb^V (8 µg/mL - 256 µg/mL) durante 72h. La viabilidad celular se evaluó empleando el ensayo de MTT (ATCC).

7.2.6. Análisis estadístico

Las diferencias en la expresión génica se probaron con un análisis de varianza de una vía y la prueba de comparaciones múltiples ANOVA. Las diferencias en la varianza para los experimentos restantes se analizaron con la prueba t no pareada. Se usó un nivel de

significancia estadística de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism (versión 6).

7.3. Resultados

7.3.1. El silenciamiento génico de MT2-A no afecta la supervivencia intracelular de *Leishmania*

Una vez obtenidos los modelos celulares de interés mediante silenciamiento génico, se evaluó la citotoxicidad del antimonio exponiendo las células a concentraciones crecientes de Sb^V . Se pudo observar que las células silenciadas ($MT_tándem^{KD}$, $MTF-1^{KD}$) se comportaban igual que las células THP-1 silvestres y las células control (Figura 10).

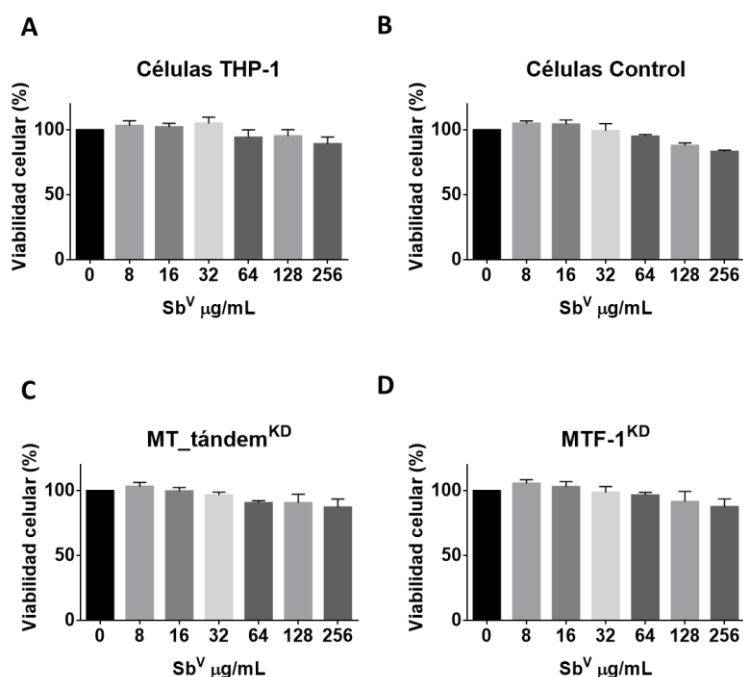


Figura 10. La viabilidad celular de las células silenciadas es comparable a la de las células control.

Citotoxicidad de celular del Sb^V a diferentes dosis (0-256 µg/mL) empleando MTT. **A)** Línea celular THP-1, fenotipo silvestre. **B)** Células control, células THP-1 transduccidas con el lentivirus. **C)** $MT_tándem^{KD}$, células THP-1 transduccidas con el lentivirus con el shARN dirigido contra las MTs. **D)** $MTF-1^{KD}$, células THP-1 transduccidas con el lentivirus con el shARN dirigido contra el factor de transcripción MTF-1. La lectura se realizó en el espectrofotómetro a 570nm. Los datos son representativos de al menos dos replicas independientes.

Con el fin de explorar la función de la MT2-A en la muerte intracelular de *Leishmania* mediada por Sb, se silenció la expresión génica de MT2-A en células THP-1 empleando un vector de expresión constitutiva de ARN de interferencia en horquilla (shARN). El silenciamiento de MT2-A (MT2-A^{KD}) se confirmó mediante RT-qPCR, observándose un 50% de silenciamiento (Figura 11). Las células MT2-A^{KD} se infectaron con *L. V. panamensis* y se expusieron a un rango de concentraciones de Sb^V (8-32 µg/mL) durante 48h. La cuantificación de la supervivencia intracelular del parásito mostró muerte dependiente de la dosis, pero no se observaron diferencias significativas en las células MT2-A^{KD} respecto de las células de control (Figura 12A), sugiriendo que el silenciamiento génico de MT2-A no tiene efecto o que el silenciamiento no fue suficiente para observar un impacto en la supervivencia del parásito. Por otra parte, tampoco se descarta la existencia de mecanismos compensatorios de la actividad de MT2-A.

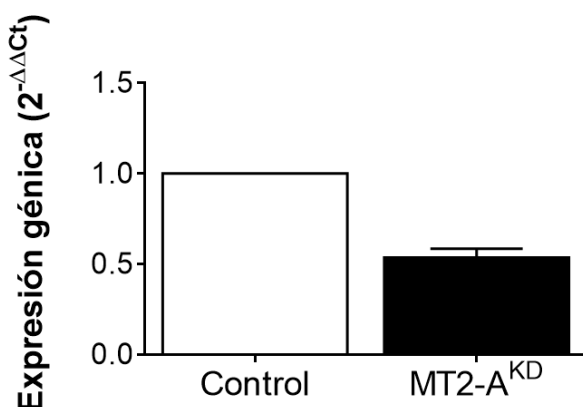


Figura 11. El shARN bloquea la expresión de MT2-A en un 50%.

Se cuantificaron los niveles de expresión génica por RT-qPCR empleando el método de 2^{-ΔΔCt}. Datos de tres replicas independientes.

Se decidió explorar la expresión génica de los otros miembros de las metalotioninas pertenecientes a las familias MT1, MT3 y MT4 en células THP-1 durante la exposición a Sb^V o acetato de zinc, sirviendo este último como control positivo de inducción de la expresión de las MT. Como se muestra en la figura 12B-C, hubo co-expresión dosis dependiente de la MT2-A junto con MT1-E, 1-F y 1-X después de la exposición a Sb^V o al acetato de Zn, lo que sustenta la posibilidad de otras MT de compensar el silenciamiento de

MT2-A. Concordante con la especificidad celular de las MT, MT3 y MT4 no se detectaron en macrófagos expuestos a Sb^{V} o al acetato de Zn (datos no mostrados).

Como prueba de principio para evaluar el papel que desempeñan otras MT en la muerte del parásito mediada por Sb, las células THP-1 se trataron con 400 μM de acetato de Zn -dosis máxima no citotóxica- durante 24h para inducir fuertemente la expresión de todas las MT. Después de la exposición al acetato de zinc, las células se infectaron con *L. V. panamensis* y se expusieron a concentraciones crecientes de Sb^{V} . El pretratamiento con Zn aumentó en un $\approx 40\%$ la capacidad de las células THP-1 de matar el parásito después de la exposición al Sb^{V} en comparación con las células control sin tratamiento con zinc (Figura 12D), sugiriendo que la expresión de MT2-A, junto con los miembros de la familia MT1 participan en la muerte intracelular *Leishmania* dependiente de Sb, y que el silenciamiento génico de estas proteínas debería promover la supervivencia de *Leishmania*.

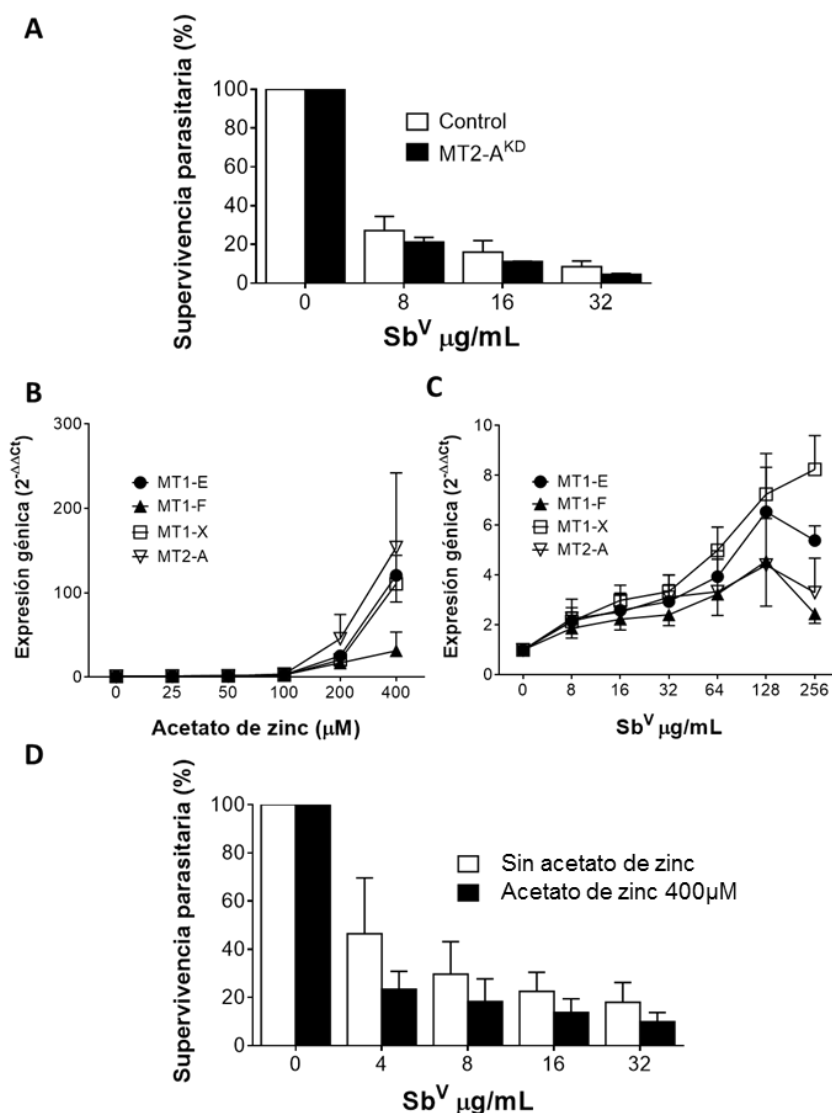


Figura 12. El silenciamiento de MT2-A^{KD} no tienen ningún efecto en la supervivencia de *Leishmania*.

A) Células control THP-1 y células MT2-A^{KD} infectadas con *L. panamensis* y expuestas a una dosis respuesta de Sb^V (8-16-32 µg/mL). La supervivencia de *Leishmania* se expresó como porcentaje respecto del control sin droga. **B-C)** Células THP-1 expuestas a diferentes dosis de acetato de zinc (25 a 400 µM) y Sb^V (8 a 256 µg/mL), se evaluó la expresión génica de MT1-E, F, X y MT2-A. **D)** Células THP-1 pre-tratas con 400 µM de acetato de zinc durante 24h empleando como control células sin tratar. Se infectaron con *Leishmania* durante 24h y se expusieron al Sb^V durante otras 48h. La supervivencia de *Leishmania* se expresó como porcentaje respecto del control sin droga y se evaluó por RT-qPCR. Los datos expresión génica se evaluaron por RT-qPCR empleado el método de 2^{-ΔΔCt}. Datos representativos de al menos tres replicas independientes.

7.3.2. El silenciamiento de las MT en tándem es revertido por su fuerte inducción durante la infección por *Leishmania* y la exposición al Sb^V

Para demostrar que otras MTs podrían compensar el efecto del silenciamiento de MT2-A, se construyó un vector de shARN dirigido contra los miembros de la familia MT1 y MT2 en tándem (MT_tandem^{KD}), aprovechando su alta homología en la secuencia nucleotídica (Figura 13A). Se evaluó el silenciamiento de los genes MT1-E, 1-F, 1-X y MT2-A, obteniendo un silenciamiento génico cercano al 90% para estos cuatro genes (Figura 13B). Posteriormente, las células MT_tandem^{KD} se diferenciaron a macrófagos, se infectaron con *L. V. panamensis* y se expusieron al Sb^V. Durante la evaluación de la supervivencia intracelular del parásito no se observaron diferencias significativas en las células MT_tandem^{KD} en comparación con las células control (Figura 13C). Teniendo en cuenta que la expresión de las MT es fuertemente inducida por *Leishmania* y el Sb^V, se evaluó si el efecto de silenciamiento realmente se mantuvo durante las condiciones experimentales (infección y exposición a la droga). En contraste con la eficiencia del silenciamiento del MT_tandem^{KD} a nivel basal, el efecto de silenciamiento en el MT_tandem^{KD} fue completamente revertido durante la infección y el tratamiento con Sb^V (Figura 13D), concordando con la fuerte sobre-expresión de las MT bajo condiciones de estrés. La pérdida del silenciamiento génico durante las condiciones experimentales (infección + droga) no permite descartar aún el papel de las MT en la supervivencia intracelular de *Leishmania*.

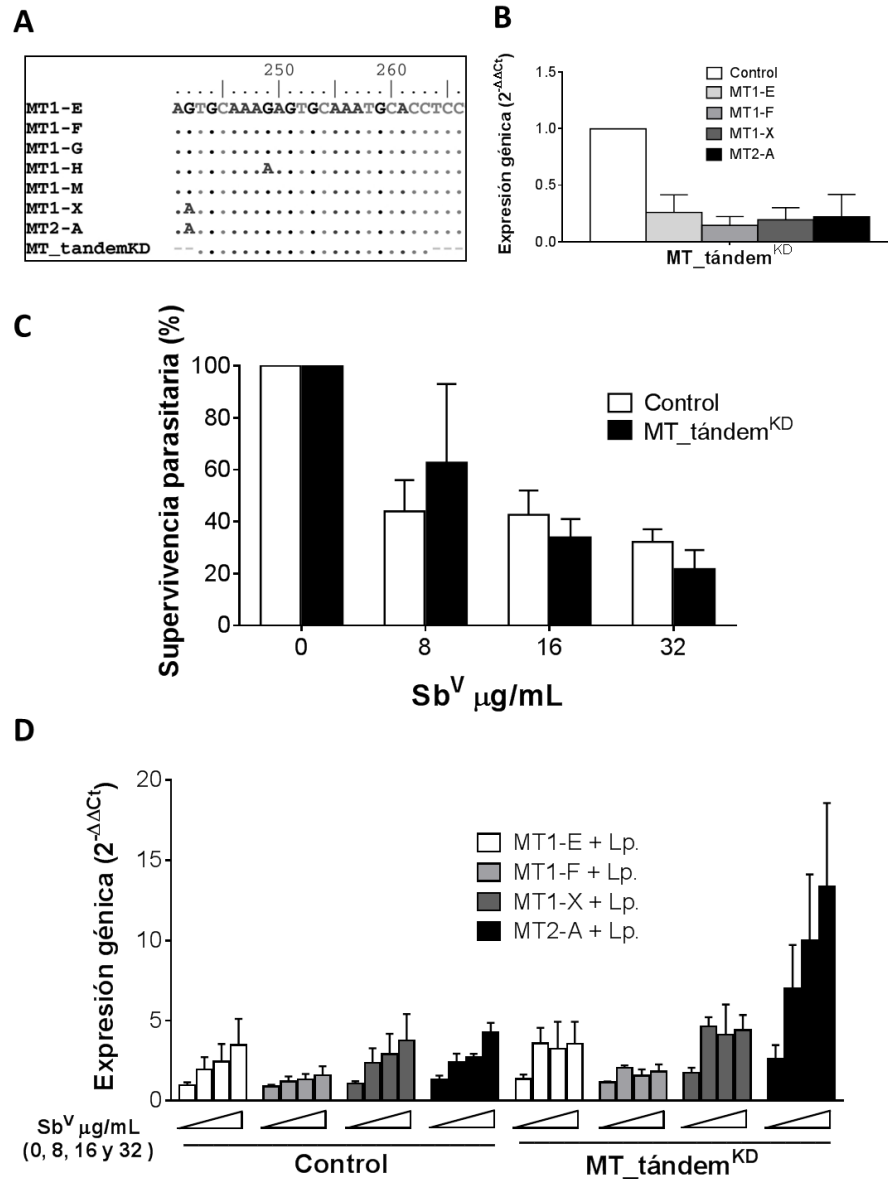


Figura 13. El silenciamiento en tándem de las MTs es revertido por su fuerte inducción bajo condiciones de estrés.

A) se diseñó un shARN capaz de silenciar todas las MT al mismo tiempo, MT_tandem^{KD}. **B)** Evaluación del silenciamiento de las MT1-E, F, X y MT2-A en las células THP-1 parentales. **C)** Células THP-1 control (vector pLKO.1 vacío) y células MT_tandem^{KD} fueron infectadas con *Leishmania* y expuestas a diferentes concentraciones del Sb^V (8-16-32 μ g/mL) durante 48h. La supervivencia de *Leishmania* se evaluó por RT-qPCR y se expresó como porcentaje respecto del control sin droga. **D)** Se evaluó la expresión de las MT1-E, F, X y MT2-A bajo las condiciones experimentales (infección + Sb^V) tanto en las células control como en las MT_tandem^{KD}. La barra de concentración creciente indica que cada metalotionina fue evaluada a las dosis de 0, 8, 16 y 32 μ g/mL de Sb^V. Los datos expresión génica se evaluaron por RT-qPCR empleado el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Datos representativos de al menos tres replicas independientes.

7.3.3. El silenciamiento génico de MTF-1 reprime eficientemente la inducción de las MT

A continuación, se indagó si el silenciamiento del factor de transcripción de respuesta a metales 1 (MTF-1), el principal factor de transcripción que regula la expresión de las MT durante el estrés inducido por metales (149), podría limitar la inducción transcripcional de las MT bajo las condiciones experimentales. Utilizando shARN, MTF-1 fue silenciado en un 50% (Figura 14A). La expresión de las MT en células THP-1 MTF-1^{KD} se evaluó en condiciones basales y experimentales. Se observó una ligera reducción (5% a 40%) de la expresión de los genes MT1 y MT2 en condiciones basales (Figura 14B). Sin embargo, la expresión de las MT se reprimió por completo en células infectadas y expuestas al Sb^V (Figura 14C). Obteniendo finalmente un sistema celular con inhibición transcripcional de las MT (tanto para los miembros de la familia MT1 y MT2) en el cual evaluar el rol de las MT en el efecto leishmanicida del Sb^V.

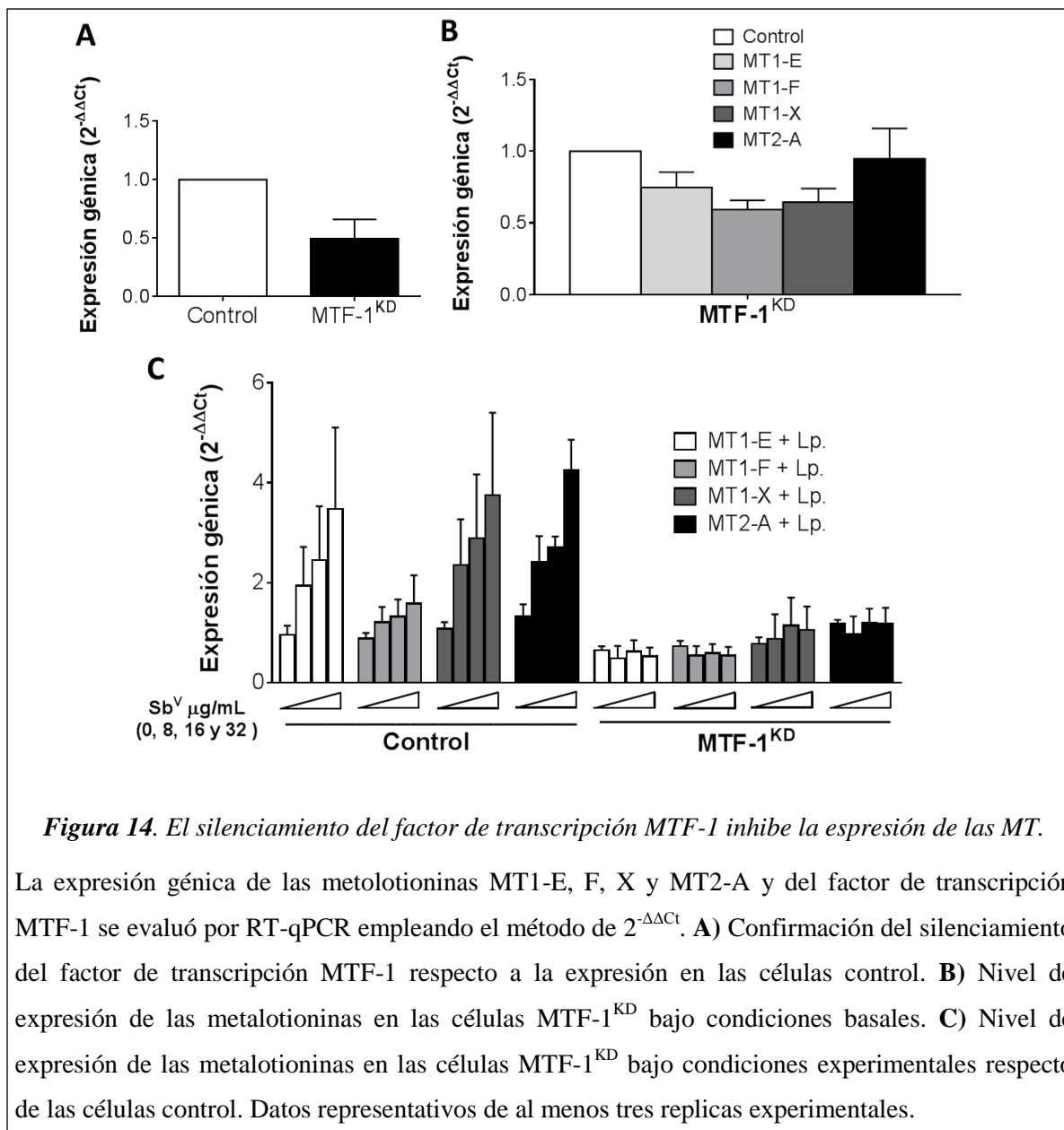


Figura 14. El silenciamiento del factor de transcripción *MTF-1* inhibe la expresión de las *MT*.

La expresión génica de las metalotioninas MT1-E, F, X y MT2-A y del factor de transcripción MTF-1 se evaluó por RT-qPCR empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. **A)** Confirmación del silenciamiento del factor de transcripción MTF-1 respecto a la expresión en las células control. **B)** Nivel de expresión de las metalotioninas en las células MTF-1^{KD} bajo condiciones basales. **C)** Nivel de expresión de las metalotioninas en las células MTF-1^{KD} bajo condiciones experimentales respecto de las células control. Datos representativos de al menos tres replicas experimentales.

7.3.4. El silenciamiento génico de MTF-1 favorece la supervivencia intracelular de *Leishmania*

Los macrófagos MTF-1^{KD} se infectaron con *L.V. panamensis* y se expusieron al Sb^V (8 - 32 µg/mL) por 48h. La supervivencia intracelular del parásito se evaluó por RT-qPCR. Como era de esperarse, la muerte del parásito mediada por Sb fue normal en las células control, donde se registraron valores de carga parasitaria inferiores al 50% para todas las dosis de Sb^V evaluadas (Figura 15). Sin embargo, la supervivencia de *Leishmania* aumentó significativamente en células MTF-1^{KD} en comparación con células de control (Figura 15),

y fue superior al 50% para todas las dosis evaluadas, e incluso hasta del 75% en la dosis de 8 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V . Estos datos sugieren que las células MTF-1^{KD} favorece la supervivencia intracelular de *Leishmania* mediante la inhibición de la expresión de las MT.

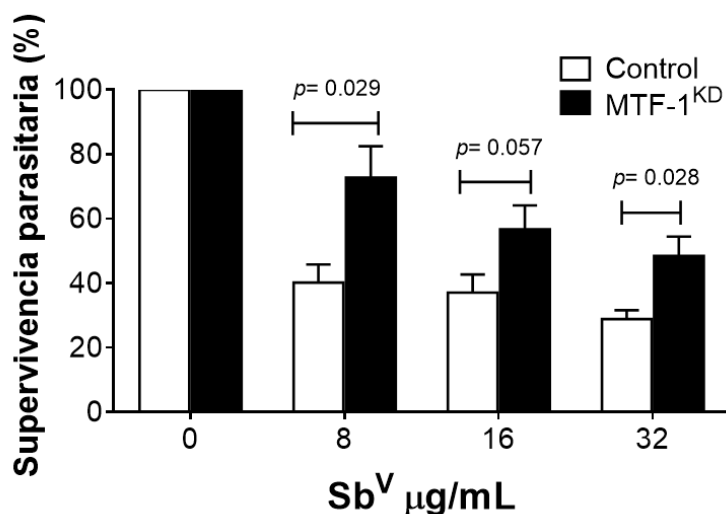


Figura 15. *Leishmania V. panamensis* sobrevive en presencia del Sb^V en las células MTF-1^{KD} .

Células control y MTF-1^{KD} infectadas con *Leishmania* y expuestas al Sb^V (8-16-32 $\mu\text{g/mL}$) durante 48h. La supervivencia de *Leishmania* se expresó como porcentaje respecto del control sin droga y se evaluó por RT-qPCR empleando como blanco molecular el 7SLARN de *Leishmania*. Datos representativos de cuatro replicas experimentales independientes. Las diferencias estadísticas se calcularon empleando Mann-Whitney test.

7.4. Discusión

La terapia antimonial, el tratamiento de primera línea para la leishmaniasis en varios países endémicos, se ha utilizado durante más de 100 años (46). Sin embargo, su mecanismo de acción y los factores del hospedero que modulan la exposición del parásito a nivel intracelular a la droga siguen siendo poco conocidos. Recientemente, el papel de la célula hospedera en el metabolismo y detoxificación del antimonio ha ganado mayor atención, debido a su participación en el desenlace terapéutico de la enfermedad y como potencial blanco para modular y optimizar la exposición del parásito a la droga (29).

Las metalotioneínas (MT) se identificaron a principios de los años 70 y se caracterizaron inicialmente como proteínas de unión a cadmio (Cd) con un papel importante en la

detoxificación de este metal (150). Estudios posteriores demostraron las MT también podían unir otros metales, incluido el Sb (130), protegiendo a las células de la toxicidad inducida por metales. Esta función ha sido respaldada por estudios en modelos murinos knock-out para MT1/MT2 en los que hubo una mayor toxicidad del Cd, Hg, Cu, Zn, As (un metal de transición estrechamente relacionado con Sb) y cisplatino (141, 144, 151–153), mientras que ratones transgénicos que sobre-expresaban las MT presentaron mayor tolerancia a la hepato- y nefrotoxicidad inducida por metales (150, 154, 155). Las poblaciones humanas ocupacionalmente o ambientalmente expuestas a Cd o As, mostraron un aumento en los niveles de expresión génica de las MT (156–158), lo que permitió sugerir a las MT como biomarcadores de exposición a metales tóxicos (156). A pesar de esto, la función y el impacto de las MT durante el tratamiento con Sb^V (metal tóxico) aún no se había explorado.

Los resultados obtenidos en este estudio, junto con los datos de expresión génica informados previamente por otros autores, confirman una alta inducción de las MT en los macrófagos humanos después de la infección con diferentes especies de *Leishmania* y durante la exposición a Sb^V (28, 100, 146). Esto, junto con un reporte previo de correlación inversa entre la expresión de MT2-A y la supervivencia intracelular de *L.V. panamensis* durante la exposición a Sb^V, sugirieron la participación de las MT en la muerte intracelular del parásito. Los resultados presentados en este trabajo proporcionan evidencia sobre la función de las MT como facilitadoras de la muerte intracelular de *Leishmania* dependiente de Sb. Aunque el mecanismo preciso por el que esto ocurre aún está por determinarse, es plausible que la función de detoxificación de metales de las MT promueva la unión del Sb a sus grupos tiol en el citoplasma, aumentando la concentración intracelular de Sb a la vez que reduce su efecto citotóxico directo hacia los macrófagos. Las MT se pueden translocar a los lisosomas (150, 159, 160); por lo tanto, los complejos de MT-Sb también podrían translocarse al lisosoma, donde las proteasas y el pH bajo facilitan la liberación del Sb desde las MT (160). La fusión de los lisosomas que contienen los complejos MT-Sb con los fagosomas donde reside *Leishmania* podría dar como resultado una mayor exposición del parásito al antimonio.

Los antimoniales pentavalentes se consideran pro-fármacos que deben reducirse a la forma trivalente, principio activo, para ejercer su actividad antileishmanial ($\text{Sb}^{\text{V}} \rightarrow \text{Sb}^{\text{III}}$). Las MT, al igual que el glutatión (GSH), tienen una función importante en el equilibrio óxido/redox celular gracias a su alto contenido de grupos tiol (130, 138–142). En condiciones de estrés, la fuerte sobre-expresión de las MT da como resultado un potencial redox que puede superar al del GSH (140, 143, 145). Se ha demostrado que el GSH promueve la reducción de Sb^{V} a Sb^{III} en células mamíferas, al igual que en *Leishmania* (49, 50). Por lo tanto, las MT podrían participar en la reducción de Sb^{V} a Sb^{III} favoreciendo la muerte de los parásitos mediada por la acumulación intracelular de la droga y posterior liberación del principio activo en el fagolisosoma.

MTF-1 es el principal factor de transcripción involucrado en la expresión de las MT durante la exposición a metales (142), y parcialmente durante la exposición/respuesta al estrés oxidativo (142, 161–164). Los resultados obtenidos en este estudio y el de otros autores demuestran que el silenciamiento génico o los knock-out de MTF-1 suprimen eficientemente la expresión celular de las MT bajo condiciones de estrés oxidativo y durante la exposición a metales (142, 149, 163). Estableciendo un vínculo entre estos dos factores a través el eje MT-Zinc-MTF-1, pues tanto el estrés oxidativo como la exposición a metales incrementan la concentración libre de zinc intracelular, requisito primordial para la activación de MTF-1 y posterior inducción de la expresión de las MT.

Sin embargo, no se puede descartar la intervención de otros mecanismos dado que la inhibición de las MT solo explica del 15 al 25% de la supervivencia del parásito. Indicando que hay otros mecanismos involucrados en el proceso de muerte/supervivencia del parásito a nivel intracelular. De hecho, MTF-1 puede modular la expresión de otros genes tales como: ZnT1, ZIP10, ZIP8 y FPN1, proteínas relacionadas con el transporte y la homeostasis del zinc (165–170). ZnT1 y FPN1 se han descrito como transportadores de membrana que participa en el eflujo del zinc. Las células que presentan resistencia a la toxicidad inducida por altas concentraciones de zinc tienden a regular positivamente la expresión de ZnT1 o FPN1 (170, 171). Por otro lado, ZIP10 funciona como un transportador de influjo de zinc, el cual se sobre-expresa cuando hay deficiencia de zinc en el medio. La activación de MTF-1 mediada por el zinc inhibe la expresión de ZIP10,

disminuyendo la captación del zinc al espacio intracelular (169). El eje zinc-ZIP8-MTF1 se describió como participante activo en la patogénesis de la osteoartritis. La sobre-expresión de ZIP8 mediada por MTF-1 aumentó el ingreso de zinc a la célula y este incremento de la concentración de zinc promovió la expresión de enzimas que participan en la degradación de la matriz extracelular, tales como: MMP3, MMP9, MMP12, MMP13 y ADAMTS5, acentuando la progresión de la osteoartritis (168). El papel de estos transportadores en el transporte del Sb y su relación con la supervivencia de *Leishmania* a nivel intracelular ameritan futuras investigaciones.

La homeostasis del zinc ha mostrado ser un factor clave para promover una adecuada respuesta inmune (172, 173). El silenciamiento de MTF-1, que a su vez reprime la inducción de las MT puede tener impacto en la homeostasis de dicho metal afectando indirectamente la respuesta inmune del hospedero. La depleción del zinc en ensayos *in vitro* ha mostrado que incrementa la capacidad fagocítica de los macrófagos al igual que el estallido respiratorio. No obstante, su capacidad de producir citoquinas proinflamatorias como TNF α se vio disminuida (174). Los resultados de este estudio no descartan un posible impacto en la respuesta inmune de los macrófagos influenciada por la homeostasis del Zn mediada por las MT.

En conjunto, nuestros resultados destacan el papel de las MT en la unión de metales tóxicos/terapéuticos como el antimonio, resaltando su potencial aprovechamiento para modular la biodisponibilidad del antimonio a nivel intracelular, incrementando la exposición del parásito y promoviendo su muerte, para finalmente optimizar la eficacia terapéutica de estos medicamentos. Estos hallazgos ilustran procesos homeostáticos relacionados con el metabolismo del antimonio no descritos previamente que participan durante el tratamiento de infecciones microbianas intracelulares. Se evidencia como un mecanismo que promueve la protección de la célula hospedera, en este caso contra el estrés oxidativo inducido por el Sb, puede a su vez mejorar la actividad leishmanicida de la terapia antimonial.

8. Capítulo 3

Perfilado metabólico y biomarcadores de respuesta terapéutica y de toxicidad del antimonio de meglumina en pacientes con leishmaniasis cutánea.

“Metabolic profiling and biomarkers of therapeutic response and toxicity of meglumine antimoniate in cutaneous leishmaniasis patients”

Deninson Alejandro Vargas¹, Miguel Dario Prieto¹, Alvaro José Martínez¹, Alexandra Cossio¹, Karl E. V. Burgess^{2,3}, Richard J.S. Burchmore^{2,3}, María Adelaida Gómez¹,

¹ Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, CIDEIM, Cali, Colombia.

² Glasgow Polyomics, Wolfson Wohl Cancer Research Centre, Garscube Campus, College of Medical Veterinary & Life sciences, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom.

³ Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom.

Sometido a: Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

Hallazgos principales

- La exposición de los pacientes al antimonio tiene un efecto significativo en la modulación del metaboloma plasmático.
- Los metabolitos relacionados con el balance energético y equilibrio redox son diferencialmente modulados entre pacientes con cura o falla terapéutica.
- La taurina, alantoína, piruvato y la N-acetilglutamina fueron identificados como potenciales metabolitos predictores y pronósticos de respuesta terapéutica con antimoniales.
- La alantoína potencia el efecto leishmanicida del antimonio.

8.1. Antecedentes

La identificación de biomarcadores de respuesta terapéutica y de pronóstico fácilmente accesibles, y medibles objetivamente son una necesidad para la LC, donde aún no se cuenta con biomarcadores de respuesta terapéutica que puedan ser empleados en el contexto clínico. Para el caso de la tripanosomiasis africana se han realizado estudios enfocados en identificar biomarcadores metabólicos que permitan predecir el estadio y la cura de la enfermedad (175). La neopterina, detectada en líquido céfalo raquídeo fue el biomarcador con mayor potencial de predecir el desenlace terapéutico de los pacientes infectados con *Trypanosoma brucei gambiense* (175, 176). Adicionalmente, el 5-hidroxitriptófano mostró 100% de sensibilidad y especificidad para discriminar entre los pacientes en estadio 1 de los pacientes en estadio 2 de la enfermedad (175).

Los enfoques fármaco-metabolómicos han contribuido a la comprensión del mecanismo de acción de los fármacos y en la identificación de las firmas metabólicas asociadas con la respuesta terapéutica en enfermedades como el cáncer y trastornos neurodegenerativos, entre otras (177). La factibilidad de obtener muestras para los estudios de metabolómica como suero, plasma, saliva u orina, y la menor proporción de metabolitos en comparación con el genoma (~ 30,000 genes : ~ 2,500 metabolitos), facilitan su aplicación para el descubrimiento de biomarcadores (40). La aplicación de la metabolómica en enfermedades infecciosas desatendidas como la leishmaniasis, ha sido poco explorada y hasta la fecha no hay reportado ningún estudio en pacientes con LC tratados con Glucantime® donde se emplee el perfilamiento metabólico de muestras de plasma usando LC/MS. En este estudio buscamos implementar un enfoque de perfilamiento metabólico de alto rendimiento para identificar biomarcadores predictivos y pronósticos de respuesta terapéutica frente al tratamiento antimonial en pacientes con LC causada por especies de *Leishmania Viannia*, así como describir las perturbaciones metabólicas asociadas con la exposición al fármaco.

8.2. Materiales y métodos

8.2.1. Diseño del estudio y participantes

Estudio diseñado con el objetivo de identificar biomarcadores de respuesta terapéutica en pacientes con LC mediante la caracterización de los perfiles metabólicos en muestras de plasma. Se incluyeron 39 pacientes con diagnóstico parasitológico confirmado de LC, de 18

a 47 años de edad, con un tiempo de evolución de la lesión cutánea <6 meses y con una adherencia al tratamiento con Glucantime® > 85% (Tabla 5). Los pacientes recibieron el tratamiento estándar de 20 mg/kg/día durante 20 días, las evaluaciones clínicas de respuesta al tratamiento se llevaron a cabo al final del tratamiento y a la semana 26 después de iniciado el tratamiento, momento en que se determinó la respuesta terapéutica definitiva (Diagrama 1). La curación se definió como una reepitelización completa de la lesión en ausencia de signos de inflamación. La falla al tratamiento se definió como reepitelización incompleta y/o presencia de induración, bordes elevados u otra evidencia de inflamación de la(s) lesión(es); reactivación de la(s) lesión(es) original(es); o aparición de nuevas lesiones durante el período de seguimiento.

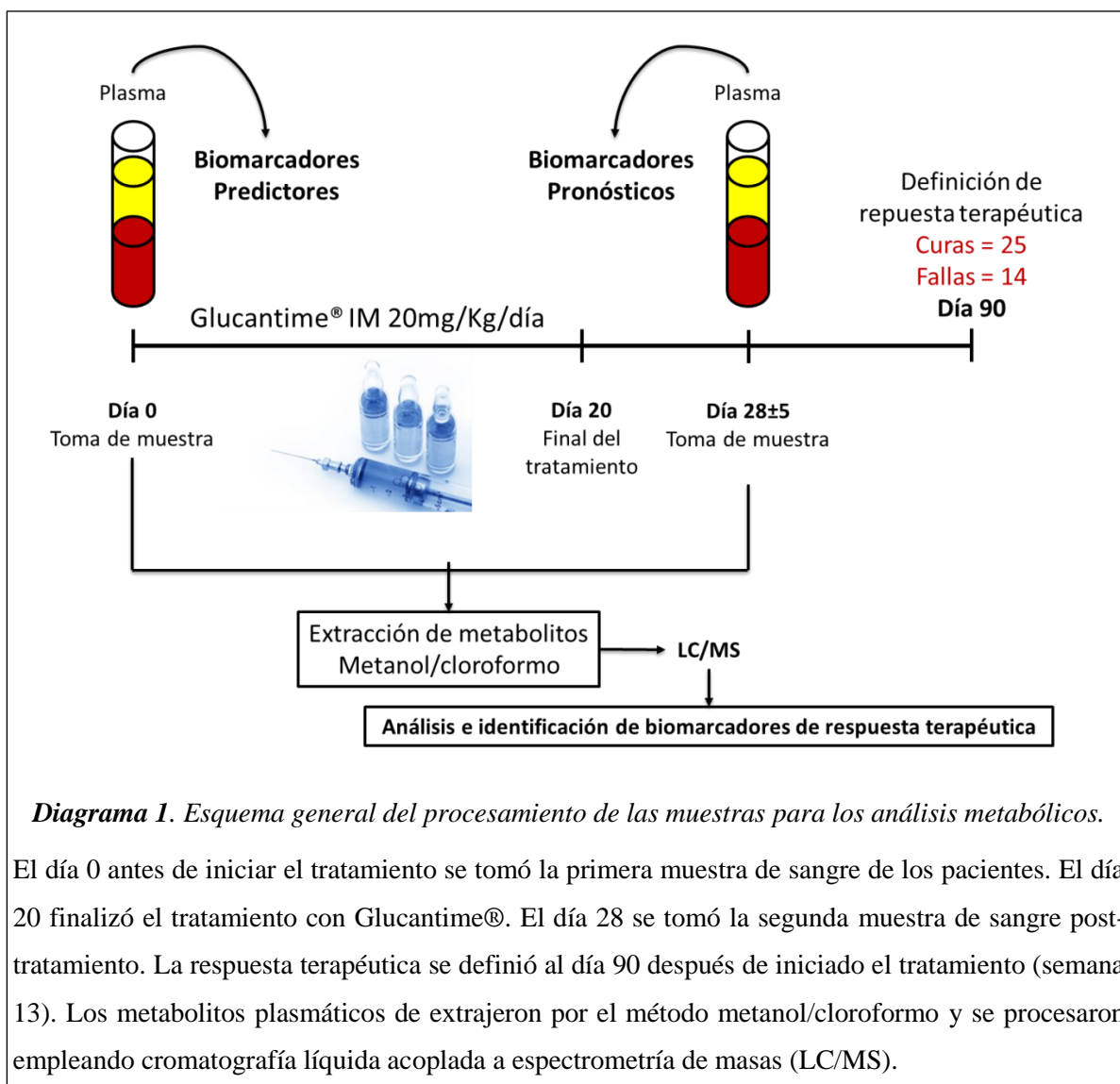


Diagrama 1. Esquema general del procesamiento de las muestras para los análisis metabólicos.

El día 0 antes de iniciar el tratamiento se tomó la primera muestra de sangre de los pacientes. El día 20 finalizó el tratamiento con Glucantime®. El día 28 se tomó la segunda muestra de sangre post-tratamiento. La respuesta terapéutica se definió al día 90 después de iniciado el tratamiento (semana 13). Los metabolitos plasmáticos se extrajeron por el método metanol/cloroformo y se procesaron empleando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).

Los eventos adversos (EA) se definieron mediante evaluación médica, criterios clínicos y de laboratorio estandarizados (por nombre y gravedad) de acuerdo con los Criterios de toxicidad definidos por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, V 4.0 (178). La causalidad se estableció utilizando los criterios WHO-UMC y el algoritmo de Naranjo (179, 180). Los EA se informaron como posiblemente, probablemente o definitivamente relacionados con el tratamiento (Tabla 5) y, por lo tanto, se consideraron como reacciones adversas a medicamentos (RAM).

8.2.2. Control de calidad de datos clínicos

El control de calidad de los datos clínicos consistió la doble digitación de los datos desde los formatos de reporte caso a una base de datos de Microsoft Office Access, monitoreo de datos externos y solución de discrepancias por consenso.

8.2.3. Procesamiento de muestras y extracción de metabolitos

El plasma se obtuvo a partir de muestras de sangre periférica anticoagulada con heparina, mediante centrifugación a 800 g por 10 minutos. Para la extracción de los metabolitos del plasma (moléculas de <1200 Da), todas las muestras fueron procesadas en un solo lote, por un investigador en el mismo día. Brevemente, se mezclaron 100 µL de plasma con cloroformo: metanol (en una proporción 1:3), con agitación constante a 4°C durante 1 h. Luego se centrifugó durante 10 min a 14000 g a 4°C y el sobrenadante con los metabolitos del plasma se transfirió y almacenó a -80 ° C hasta el momento de su procesamiento.

8.2.4. Adquisición y procesamiento de datos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS)

Las muestras se analizaron por interacción hidrófila LC/MS (UltiMate 3000 RSLC, Thermo Fisher) usando una columna ZIC-pHILIC de 150 x 4,6 mm (Merck SeQuant) corriendo a 300 µL/min y detección en Orbitrap Exact (Thermo Fisher). Los parámetros del espectrómetro de masas fueron: 50,000 de potencia de resolución en modo de conmutación positivo/negativo. El voltaje de ionización por electropulverización (ESI) fue de 4.5 kV en modo positivo y de 3 kV en modo negativo. Las soluciones tampón consistieron en (A): carbonato de amonio 20 mM (Sigma) disuelto en H₂O y (B): Merck SeQuant: acetonitrilo (Rathburn Chemicals). El gradiente varió del 20% A: 80% B al 80% A: 20% B en 15 min,

seguido de un lavado al 95% A: 5% B durante 3 min, y el equilibrio al 20% A: 80% B por 5 minutos.

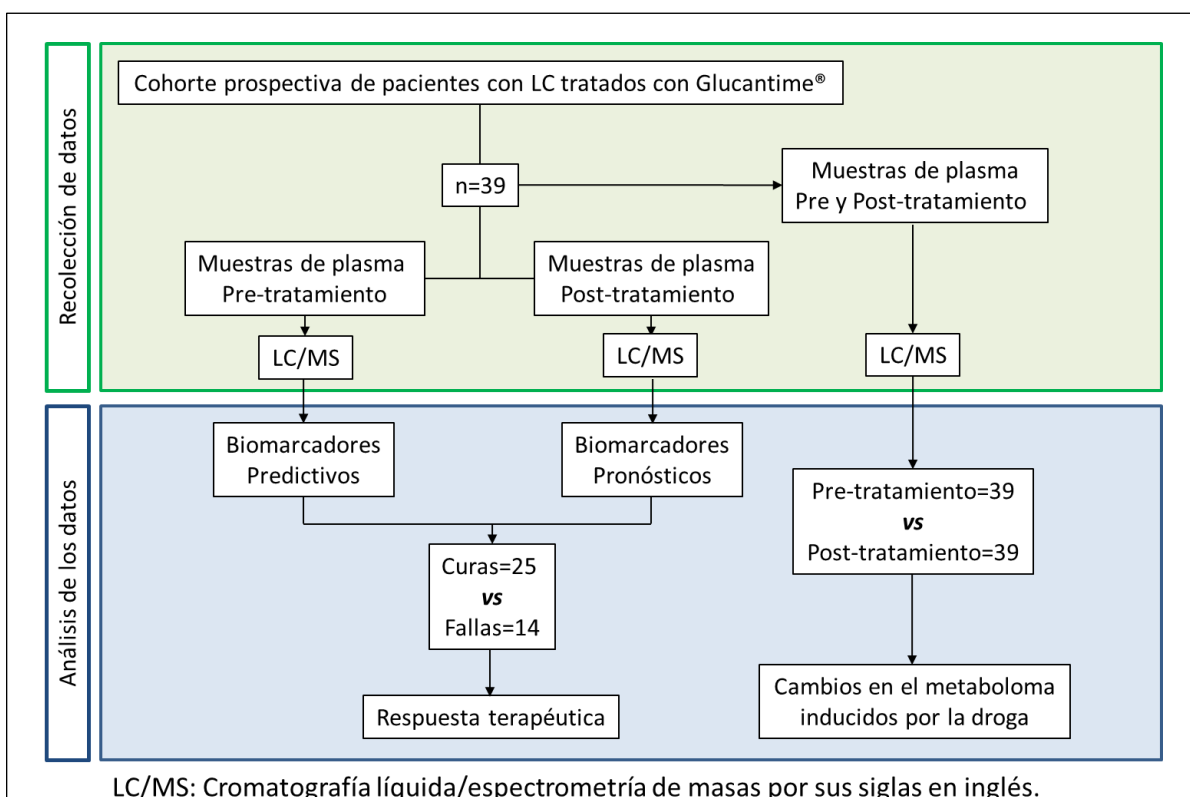
Los datos crudos de la LC/MS (por sus siglas en inglés) se procesaron utilizando XCMS (181), MzMatch (182) y scripts internos desarrollados en R para un filtrado profundo, procesamiento e identificación de los picos. Los picos se visualizaron usando PeakML Viewer (182) y los datos fueron compilados usando el software IDEOM (183). La clasificación de los metabolitos siguió las directrices del MSI (Metabolomics Standards Initiative, por sus siglas en inglés) (184). Los metabolitos fueron anotados con una tolerancia de masa <3 ppm, aquellos metabolitos emparejados en la base de datos IDEOM se describieron como metabolitos '**anotados**', mientras que los metabolitos emparejados frente a un estándar auténtico con <3 ppm de error de masa y $<5\%$ de tiempo de retención se clasificaron como '**identificados**'.

8.2.5. Control de calidad de los datos LC/MS

El control de calidad maestro (QC) se obtuvo mezclando volúmenes iguales de cada muestra. Todas las muestras de plasma de los pacientes se analizaron en un solo corrida y en un único lote de forma aleatoria. Durante la corrida se incluyeron metabolitos estándar puros con identificación auténtica al principio y al final de la corrida. Los QC se inyectaron antes de comenzar la corrida de LC/MS y cada 5 muestras para garantizar y verificar la estabilidad del equipo durante la corrida. La calidad de los cromatogramas y la reproducibilidad de la señal se verificaron mediante los análisis de los QC, los estándares puros y el cromatograma total de iones. Las muestras que mostraron una variación analítica inaceptable (desviación del tiempo de retención) se eliminaron de los análisis posteriores. También se excluyeron del análisis los picos que no emparejaron con algún metabolito (sin identificación), los metabolitos con más del 20% de valores perdidos en las muestras analizadas, una confianza de identificación <5 y los compuestos derivados del Glucantime®. Adicionalmente se realizó depuración manual de la base de datos eliminando todos aquellos metabolitos cuyos cromatogramas representaban artefactos que no fueron detectados durante la depuración digital.

8.2.6. Curación de datos y análisis estadístico

Los datos clínicos y demográficos se analizaron utilizando el software R versión 3.3.2 y STATA versión 14, empleando datos no transformados. Para los datos metabolómicos se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para identificar muestras atípicas. Para el análisis e interpretación de los datos se utilizaron MetaboAnalyst 3.0 (185), XCMS y GraphPad Prism 6. La base de datos fue normalizada por el método de normalización del cociente probabilístico (186), transformada mediante logaritmo generalizado y escalada con Pareto (187). Los análisis estadísticos empleados consistieron en pruebas univariadas (prueba t de Student y ANOVA con Fisher-LSD como Post-Hoc análisis) y multivariadas supervisadas (análisis discriminatorio de mínimos cuadrados ortogonales parciales-OPLS-DA, por sus siglas en inglés) para identificar los metabolitos asociados con la exposición al fármaco y la respuesta terapéutica (Diagrama 2). Los estadísticos del método supervisado OPLS-DA son el R^2Y y el Q^2 , que representan la suma total de la variación en Y explicada por el modelo (R^2Y) y la bondad de la predicción calculada mediante la validación cruzada (Q^2) (188). Los análisis de enriquecimiento de vías metabolitos se realizaron empleando KEGG y MetaboAnalyst 3.0. Las curvas ROC se realizaron empleando regresión logística.



LC/MS: Cromatografía líquida/espectrometría de masas por sus siglas en inglés.

Diagrama 2. Flujograma general del procesamiento y análisis de los datos metabólicos.

En el recuadro superior (verde), se señalan los procesos de recolección de la muestra y obtención de los datos. En el recuadro inferior (azul), se indican las comparaciones y análisis realizados para la identificación de biomarcadores de respuesta terapéutica y cambios en el metaboloma inducidos por la droga.

8.2.7. Ensayos de infección *ex vivo* y evaluación de la supervivencia intracelular de *Leishmania*

Se tomaron muestras de sangre periférica de 6 pacientes con LC antes del inicio del tratamiento. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP, por sus siglas en inglés) se aislaron mediante centrifugación por gradiente (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich). Los CMSP se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y se cultivaron a una concentración de 1×10^5 /pozo en placas de 96 pozos. Posteriormente las células se infectaron con *L.V. panamensis* (transfectada con el gen reportero de luciferasa) en una relación 1:1 (parásito:monocito) durante 24h, previa opsonización de los parásitos con suero humano AB+. La Taurina y alantoína (Sigma-Aldrich) se agregaron por separado o en combinación (exposición simultánea) con 4 $\mu\text{g/mL}$

de Sb^V durante 72h a 34°C, 5% de CO₂. Finalmente, la carga parasitaria fue evaluada empelando luminometría (189).

8.3. Resultados

8.3.1. Características clínicas y demográficas de los participantes del estudio

Se incluyeron un total de 39 participantes, 25 que curaron con la terapia de Glucantime® y 14 que fallaron (Tabla 5). La mayoría de los participantes (92%) eran hombres con una edad promedio de 30 años de ascendencia afrocolombiana del departamento de Nariño, Colombia. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las características demográficas o clínicas entre los grupos, con la excepción del género, donde el grupo de las fallas presentó las tres únicas mujeres incluidas en el estudio ($p = 0.04$). De los 39 participantes, 27 reportaron al menos una reacción adversa al medicamento (69%), entre las más comunes se reportó fiebre (18.4%), seguido de dolor en el sitio de inyección (9.2%) y dolor de cabeza (9.2%) (Tabla 5). No hubo reporte de eventos adversos serios.

Tabla 5. Características clínicas y demográficas de los pacientes.

Características	Total	Curas	Fallas	Valor p *
Número de pacientes	39 (100)	25 (64)	14 (36)	-
Género, n (%)				
Hombres	36 (92)	25 (100)	11 (78.6)	0.039 [‡]
Mujeres	3 (8)	-	3 (21.4)	
Edad en años, mediana (rango)	30 (18 - 47)	30 (18 - 45)	29.5 (19 - 47)	0.735 [§]
Etnia, n (%)				
Afrodescendiente	37 (95)	25 (100)	12 (85.7)	0.122 [‡]
Otro	2 (5)	-	2 (1.3)	
Peso, media (SD), Kg	69.4 (8.4)	67.6 (7.4)	72.4 (9.6)	0.092 [§]
Tiempo de evolución de la enfermedad (meses). Mediana (rango)	1 (1 - 5)	2 (1 - 5)	1 (1 - 5)	0.311 [§]
Número de lesiones por paciente. Mediana (rango)	2 (1 - 6)	1 (1 - 5)	2 (1 - 6)	0.634 [§]
Porcentaje de adherencia al tratamiento. Mediana (rango) [†]	100 (85-100)	100 (98-100)	100 (85-100)	0.075 [‡]
Área geográfica del reporte de la infección (Departamento). n (%)				
Nariño	32 (82.1)	20 (80)	12 (85.7)	0,655 [‡]
Otro	7 (17.9)	5 (20)	2 (14.3)	
Especies aisladas de <i>Leishmania</i> , n(%)				
<i>L. V. panamensis</i>	31 (79.5)	19 (76)	12 (85.7)	0,813 [‡]
<i>L. V. braziliensis</i>	2 (5.1)	2 (8)	0	
No disponible o contaminada	6 (15.4)	4 (16)	2 (14.3)	
Reacciones Adversas al Medicamento (RAM)				
Pacientes que reportaron RAM, n (%)				
Ninguna	12 (30.8)	6 (24)	6 (42.9)	0.286 [‡]
Al menos una	27 (69.2)	19 (76)	8 (57.1)	
Intensidad de las RAM, n (%)				
Leve	24 (89)	17 (89)	7 (87)	1,000 [‡]
Moderada	3 (11)	2 (11)	1 (13)	
Tipo de reacción, n (%)				
Fiebre	18 (26.1)	12 (29.3)	6 (21.4)	0.480 [‡]
Dolor en el sitio de la inyección	9 (13.0)	3 (7.3)	6 (21.4)	
Dolor de cabeza	9 (13.0)	7 (17.1)	2 (7.1)	
Artralgia	9 (13.0)	5 (12.1)	4 (14.3)	
Fatiga	5 (7.2)	3 (7.2)	2 (7.1)	
Mialgia	5 (7.2)	4 (9.8)	1 (3.6)	
Otras	14 (20.3)	7 (17.1)	7 (25.0)	

* Comparación entre curas vs fallas. [†] Basado en las ampollas recibidas vs. las ampollas ordenadas. [‡] Chi2/Fisher. [§] T-test/Wilcoxon rank sum test.

8.3.2. La exposición a Glucantime® altera el metaboloma en el plasma de los pacientes con LC

Los datos metabólicos de 4 pacientes fueron excluidos de los análisis (3 que curaron y 1 que falló); dos de ellos tenían cromatogramas que no cumplían los parámetros mínimos de calidad, mientras que los otros 2 se identificaron como valores atípicos en los análisis multivariados de componente principal (Figura 16). Después de depuración de la base de datos, la transformación de los datos y el control de calidad, se detectaron finalmente 536 metabolitos en las muestras de plasma de los 35 pacientes, de los cuales 48 fueron identificados en referencia a los estándares puros empleados como controles y el resto (488/536) fueron anotados de acuerdo a los criterios de la MSI (Anexo 3). En todas las muestras post-tratamiento, se pudo detectar la N-metil-glucamina, un subproducto del Glucantime®, (intensidad relativa media de 26.734), indicando la exposición al fármaco en la población de estudio; este metabolito fue excluido de los análisis posteriores.

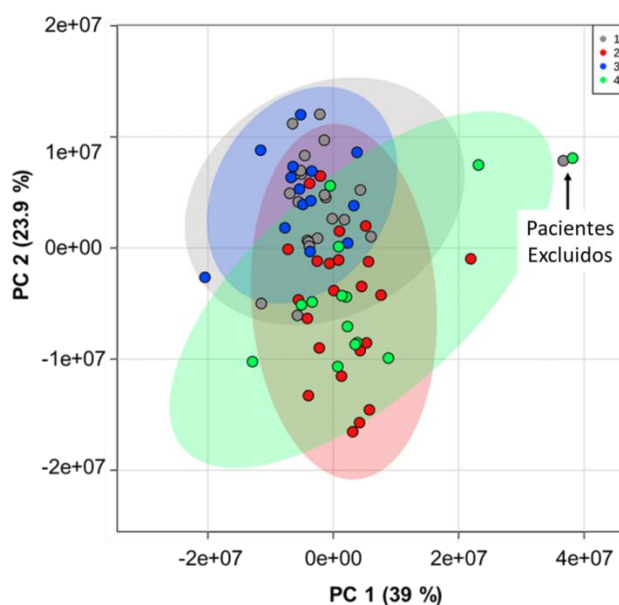


Figura 16. Analisis de componentes prinipcales de los datos metabolicos crudos.

Cada punto representa una única muestra. Los óvalos grandes representan el intervalo de confianza del 95%. **En gris**, muestras pre-tratamiento de los pacientes que curaron (1). **En rojo**, muestras post-tratamiento de los pacientes que curaron (2). **En azul**, muestras pre-tratamiento de los pacientes que fallaron (3). **En verde**, muestras post-tratamiento de los pacientes que fallaron (4). La flechan indica los pacientes que fueron excluidos (valores atípicos) de los análisis posteriores.

El 30,4% de los metabolitos detectados (163/536) presentaron modificaciones significativas después de la exposición *in vivo* al Glucantime® (prueba t de Student pareada $p \leq 0.05$, tasa de falsos descubrimientos -FDR- ≤ 0.1). De los cuales el 53% (88/163) mostraron mayor abundancia después del tratamiento, con el 20% (18/88) de metabolitos identificados y el 80% (70/88) de ellos anotados (Figura 18A y Anexo 4). En los análisis multivariados empleando el modelo supervisado OPLS-DA (se usaron todos los 536 metabolitos detectados como variables de este modelo), se establecieron como puntos de corte discriminatorios valores de $1.5 \leq p[1] \leq -1.5$ y $0.3 \leq p(\text{corr})[1] \leq -0.3$ en el S-plot, seleccionándose aquellos metabolitos con mayor capacidad discriminatoria entre los dos grupos, pre y post-tratamiento (Figura 17 y Anexo 4). Se obtuvo un valor de $R^2Y = 0.93$ y un valor de $Q^2 = 0.62$ en la prueba de validación cruzada, seleccionándose 38 metabolitos con alto potencial discriminatorio entre los grupos, los cuales también fueron identificados como significativos en los análisis univariados. De estos 38 metabolitos encontrados en común tanto en los análisis estadísticos univariados como multivariados, resalta su participación en el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga y en la β -oxidación (L-carnitina, fosfocolina, 3-metilglutarilcarnitina y cis-5-tetradecenoilcarnitina), metabolismo de la metionina-homocisteína y balance redox (fosfocolina, guanidinoacetato, S-malato, L-dehidroascorbato y betaína), y el metabolismo de nucleótidos (S-dihidroorotato, 3-metilguanina, D-ribosa y xantina), cuyas abundancias presentaron diferencias significativas después del tratamiento con Glucantime® (Figura 18B).

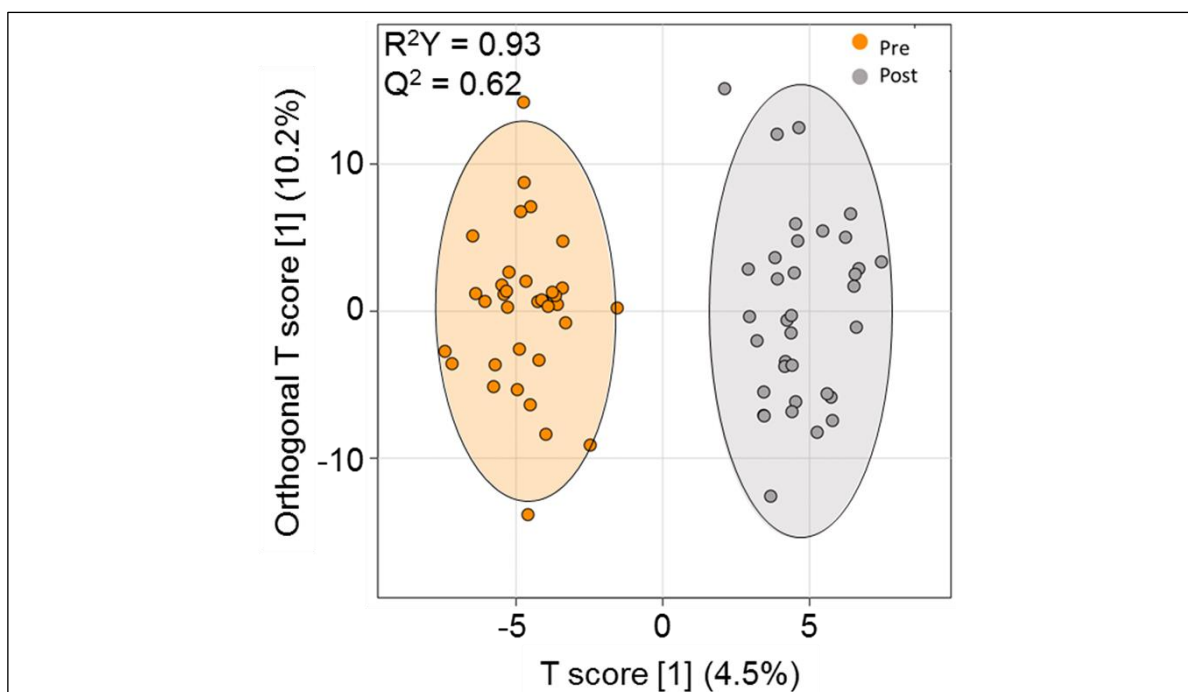
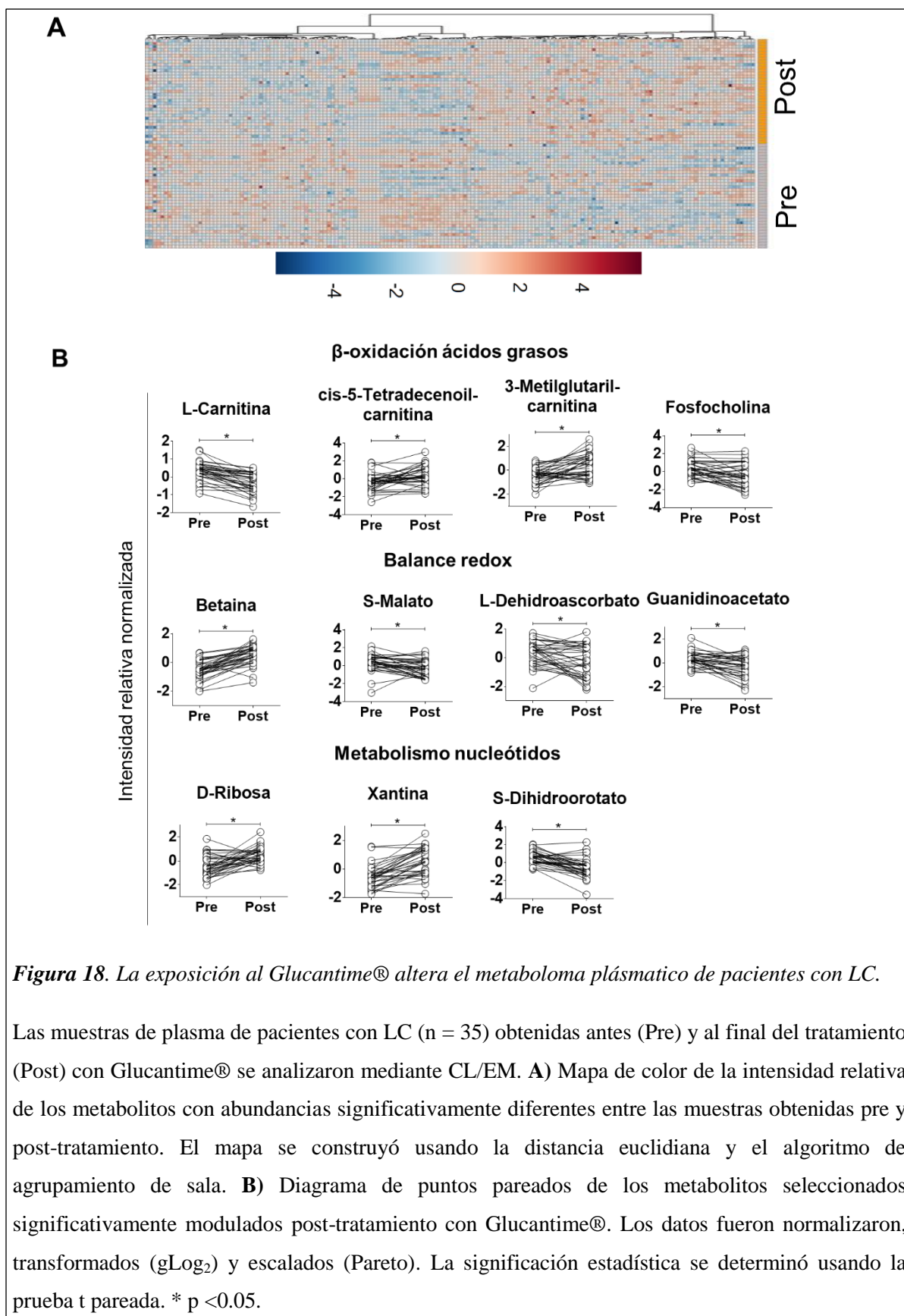


Figura 17. Modelo OPLS-DA del metaboloma plásmatico después de la exposición al Glucantime®.

Cada muestra está representada por un círculo. **En naranja**, muestras obtenidas pre-tratamiento (pre) y **en gris** muestras obtenidas post-tratamiento (post). El puntaje T [1] y el puntaje ortogonal T [1] representan el % de variación que discrimina entre y dentro de los grupos, respectivamente.

8.3.3. Los metabolitos asociados con la cicatrización de heridas y el equilibrio óxido/redox están diferencialmente modulados en los pacientes que curaron respecto de los que fallaron

Se empleó el modelo multivariado OPLS-DA para seleccionar los metabolitos con mayor capacidad discriminatoria entre los pacientes que curaron (n=22) y los pacientes que fallaron (n=13) al tratamiento con Glucantime®. Se compararon las muestras obtenidas tanto al inicio como al final del tratamiento. El modelo generado permitió la separación de las muestras pre-tratamiento y post-tratamiento de los pacientes que curaron respecto de los pacientes que fallaron, con un valor de $R^2Y = 0.96$ y un valor de $Q^2 = 0.53$ en la prueba de validación cruzada (Figura 19A). Como puntos de corte discriminatorios se emplearon valores de $0.5 \leq p[1] \leq -0.5$ y $0.2 \leq p(\text{corr})[1] \leq -0.2$ en el S-plot.



Se detectaron 126 metabolitos con potencial discriminatorio, de los cuales 109 fueron anotados y 17 fueron identificados (Anexo 4). Para guiar la selección de metabolitos con mayor capacidad predictiva y pronóstica de respuesta terapéutica, se realizó un ANOVA con un post-hoc análisis de Fisher- LSD, incluyendo los 536 metabolitos detectados. De estos análisis (ANOVA/OPLS-DA) se seleccionaron 21 metabolitos con la capacidad de discriminar entre pacientes que curaron vs los que fallaron, tanto en las muestras pre como en las muestras post-tratamiento ($p \leq 0.05$, $FDR \leq 0.1$). De estos, 5 metabolitos fueron plenamente identificados (Tabla 6-7) respecto a los estándares puros (alantoína, N-acetilglutamina, taurina, piruvato y fosfocolina). La fosfocolina, metabolito que participa en el metabolismo lipídico y de componentes de membrana, se encontró significativamente elevado en el grupo de pacientes que curaron respecto de los que fallaron en las muestras de plasma tomadas post-tratamiento, mientras los metabolitos que desempeñando un papel importante en el equilibrio óxido/redox y que participan en los procesos de cicatrización de heridas (taurina, N-acetilglutamina, alantoína y piruvato) aumentaron significativamente en los pacientes que curaron, tanto en las muestras pre como en las muestras post-tratamiento respecto de las fallas (Figura 19B).

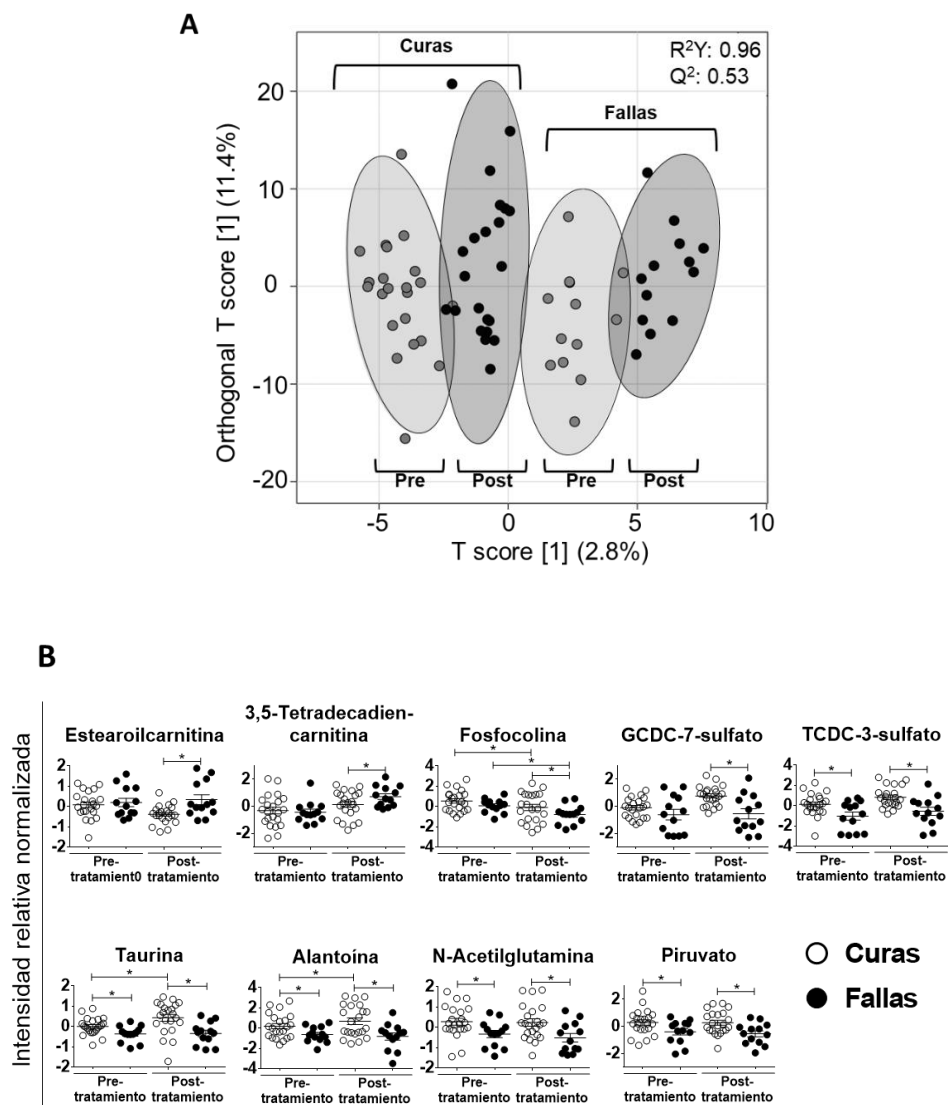


Figura 19. Metabolitos asociados con el balance redox y la cicatrización de heridas son más abundantes en los pacientes que curaron con el tratamiento.

Se analizaron los perfiles metabólicos del plasma de pacientes con LC que curaron ($n = 22$) o fallaron ($n = 13$) al tratamiento con Glucantime®. **A)** modelo OPLS-DA, presenta separación de los metabolomas de los pacientes que curaron y fallaron tanto en las muestras pre-tratamiento y post-tratamiento. **B)** Diagramas de puntos de los metabolitos modulados diferencialmente entre las curas y las fallas. Las barras representan la media y la desviación estándar. GCDC-7-sulfato: Glicoquenodeoxicolato 7-sulfato, TCDC-3-sulfato: Tauroquenodeoxicolato-3-sulfato. Los datos fueron normalizados, transformados (gLog_2) y escalados (Pareto). La significancia estadística se determinó usando la prueba t pareada. * $p < 0.05$.

Tabla 6. Biomarcadores predictores de desenlace en las muestras de plasma pre-tratamiento

Metabolito	Formula elemental	Masa (Da)	TR (min)	Abundancia relativa Media \pm SD [†]		
				Curas (n=22)	Fallas (n=13)	ANOVA
				Pre-tratamiento	Pre-tratamiento	Fisher's LSD [‡]
Alantoína [§]	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	158.04	13.28	0.19 \pm 1.21	-0.64 \pm 0.76	*
Piruvato [§]	C ₃ H ₄ O ₃	88.016	7.93	0.29 \pm 0.93	-0.40 \pm 0.86	*
N-Acetilglutamina [§]	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₄	188.08	10.57	0.27 \pm 0.79	-0.33 \pm 0.65	*
Taurina [§]	C ₂ H ₇ NO ₃ S	125.01	13.55	-0.003 \pm 0.42	-0.37 \pm 0.39	*
2-Hidroxipiridina	C ₅ H ₅ NO	95.04	7.98	-0.55 \pm 0.55	0.63 \pm 1.23	*
Ala-Lys-Ser-Arg	C ₁₈ H ₃₆ N ₈ O ₆	230.14	13.27	0.67 \pm 0.67	-0.27 \pm 1.35	*
D-Eritrosa	C ₄ H ₈ O ₄	120.04	10.34	0.03 \pm 0.54	-0.65 \pm 0.57	*
Ethilpiruvato	C ₅ H ₈ O ₃	116.05	5.34	0.34 \pm 0.51	-0.13 \pm 0.97	*
FA Metil jasmonato	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	224.14	3.94	0.23 \pm 0.97	-0.89 \pm 1.14	*
Ácido graso [¶]	C ₁₃ H ₁₈ O ₅	254.12	5.25	0.36 \pm 1.25	-0.67 \pm 0.89	*
Glu-Phe-Trp	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₆	240.1	7.71	0.40 \pm 0.84	-0.41 \pm 1.32	*
N5-Etil-L-glutamina	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	174.1	12.66	-0.58 \pm 1.23	0.40 \pm 1.08	*
N6-Metil-L-lisina	C ₇ H ₁₆ N ₂ O ₂	160.12	19.26	-0.41 \pm 0.78	0.37 \pm 0.82	*
Esterol	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392.29	4.84	-0.30 \pm 1.35	0.98 \pm 0.95	*
Tauroquenodeoxi-cholato-3-sulfato	C ₂₆ H ₄₅ NO ₉ S ₂	289.63	4.34	0.12 \pm 1.10	-1.04 \pm 1.43	*

[†] Abundancia relativa: Los datos fueron normalizados, transformación logarítmica (gLog₂) y escalados con Pareto.

TR- Tiempo de retención en minutos, Masa en Daltons, SD – Desviación estándar.

[‡] Contraste de los grupos con valores estadísticamente significativos en el Fisher LSD post-hoc test ($p \leq 0.05$). Las pruebas múltiples se corrigieron con FDR y se definieron como significativas con un $FDR \leq 0.1$.

* Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos $p \leq 0.05$ y $FDR \leq 0.1$.

[§] **En negrilla**, metabolitos identificados frente a un estándar puro autentico.

[¶] [FA methyl-hidroxi-oxo(5:2/4:0)] metil 4-[2-(2-formil-vinil)-3-hidroxi-5-oxo-ciclopentil]-butanoato.

^{||} [ST hidrox] 3alpha,7alpha-Dihidroxi-5beta-cholan-24-oic Acid.

Con el objeto de establecer cómo se comportaban los 5 metabolitos identificados (alantoína, N-acetilglutamina, taurina, piruvato y fosfocolina fosfato) dentro del mismo grupo (curas o fallas) comparando las muestras pre vs las post-tratamiento, se observó que la alantoína y la taurina presentaron un aumento significativo en la abundancia relativa al final del tratamiento en el grupo de pacientes que curaron, mientras que el fosfocolina

disminuyó significativamente en ambos grupos en las muestras post-tratamiento (Figura 19B y tabla 7).

Tabla 7. Biomarcadores pronósticos de desenlace en las muestras de plasma post-tratamiento

Metabolito	Formula elemental	Masa (Da)	TR (min)	Abundancia relativa Media \pm SD [†]		
				Curas (n=22)	Fallas (n=13)	ANOVA
				Post-tratamiento	Post-tratamiento	Fisher's LSD [‡]
Alantoína [§]	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	158.04	13.28	0.68 \pm 1.56	-0.82 \pm 1.30	*
Fosofocolina [§]	C ₅ H ₁₄ NO ₄ P	183.07	13.12	-0.10 \pm 1.43	-0.81 \pm 0.92	*
Piruvato [§]	C ₃ H ₄ O ₃	88.016	7.93	0.27 \pm 0.86	-0.54 \pm 0.79	*
N-Acetilglutamina [§]	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₄	188.08	10.57	0.23 \pm 0.86	-0.52 \pm 0.75	*
Taurina [§]	C ₂ H ₇ NO ₃ S	125.01	13.55	0.43 \pm 0.78	-0.34 \pm 0.55	*
2-Hidroxipiridina	C ₅ H ₅ NO	95.04	7.98	-0.25 \pm 0.81	0.74 \pm 1.64	*
3,5-Tetradecadien-carnitina	C ₂₁ H ₃₇ NO ₄	367.27	5.08	0.14 \pm 0.99	0.72 \pm 0.75	*
Ala-Lys-Ser-Arg	C ₁₈ H ₃₆ N ₈ O ₆	230.14	13.27	0.05 \pm 0.89	-0.96 \pm 1.25	*
D-Eritrosa	C ₄ H ₈ O ₄	120.04	10.34	0.42 \pm 0.71	-0.13 \pm 0.71	*
Ethilpiruvato	C ₅ H ₈ O ₃	116.05	5.34	0.04 \pm 0.55	-0.51 \pm 0.66	*
FA Metil jasmonato	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	224.14	3.94	0.42 \pm 0.93	-0.22 \pm 0.83	*
Ácido graso [¶]	C ₁₃ H ₁₈ O ₅	254.12	5.25	0.43 \pm 1.16	-0.67 \pm 1.13	*
Glicerolípido [#]	C ₃₉ H ₇₀ O ₄	602.53	3.7	-0.03 \pm 0.49	0.50 \pm 0.78	*
Glu-Phe-Trp	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₆	240.1	7.71	0.28 \pm 0.81	-0.73 \pm 1.26	*
Glicochenodeoxicolate 7-sulfato	C ₂₆ H ₄₃ NO ₈ S	264.64	4.66	0.77 \pm 0.72	-0.54 \pm 1.37	*
N5-Etil-L-glutamina	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	174.1	12.66	-0.04 \pm 0.90	0.66 \pm 1.21	*
N6-Metil-L-lisina	C ₇ H ₁₆ N ₂ O ₂	160.12	19.26	-0.12 \pm 0.83	0.53 \pm 0.79	*
N-acetil-L-arginina	C ₈ H ₁₆ N ₄ O ₃	216.12	13.51	-0.10 \pm 0.87	-0.65 \pm 0.77	*
Estearoilcarnitina	C ₂₅ H ₄₉ NO ₄	427.37	4.72	-0.39 \pm 0.45	0.33 \pm 0.87	*
Tauroquenodeoxicolato-3-sulfato	C ₂₆ H ₄₅ NO ₉ S ₂	289.63	4.34	0.82 \pm 1.01	-0.56 \pm 1.42	*

[†] Abundancia relativa: Los datos fueron normalizados, transformación logarítmica (gLog₂) y escalados con Pareto.

TR- Tiempo de retención en minutos, Masa en Daltons, SD – Desviación estándar.

[‡] Contraste de los grupos con valores estadísticamente significativos en el Fisher LSD post-hoc test ($p \leq 0.05$). Las pruebas múltiples se corrigieron con FDR y se definieron como significativas con un $FDR \leq 0.1$.

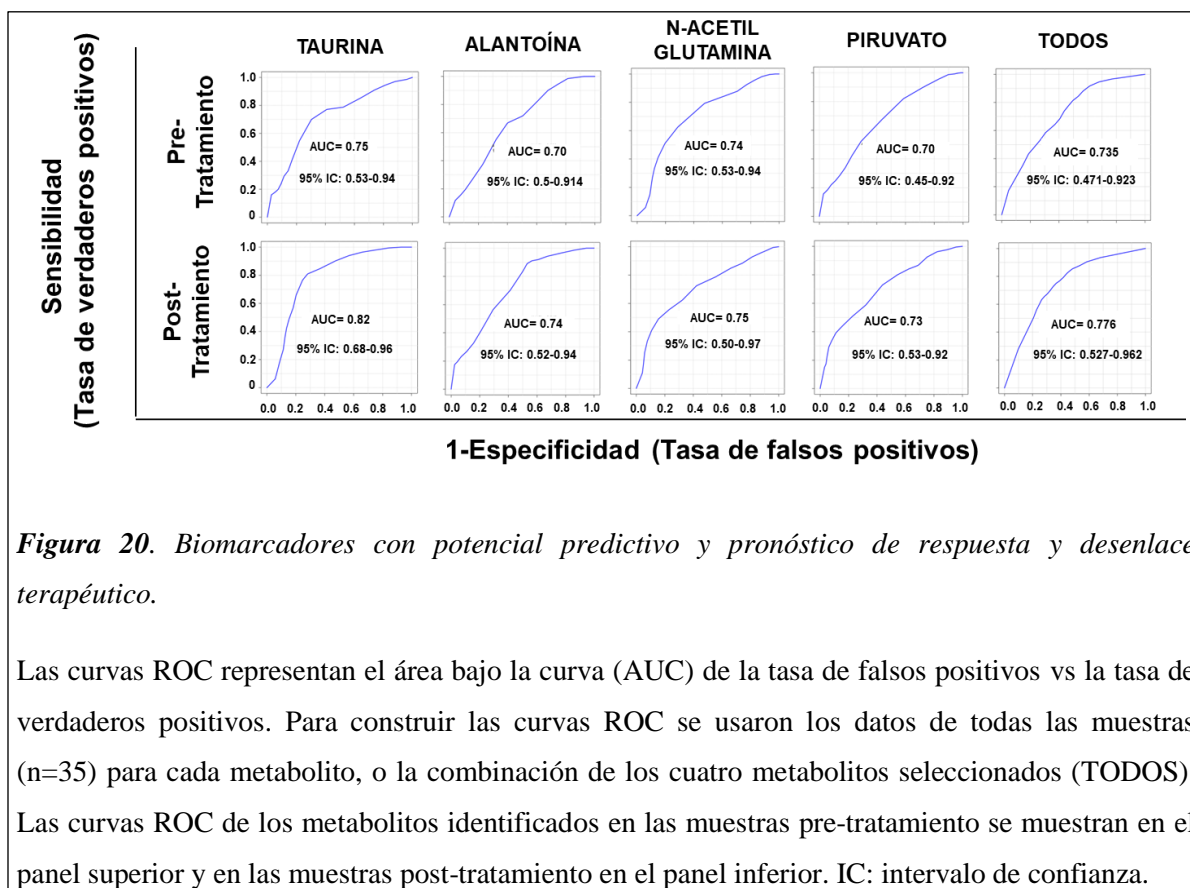
* Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos $p \leq 0.05$ y $FDR \leq 0.1$.

[§] **En negrilla**, metabolitos identificados frente a un estándar puro autentico.

[¶] [FA methyl-hidroxi-oxo(5:2/4:0)] metil 4-[2-(2-formil-vinil)-3-hidroxi-5-oxo-ciclopentil]-butanoato.

[#] [GL metil(15:0/8:0)] 1-(14-metil-pentadecanoil)-2-(8-[3]-ladderane-octanil)-sn-glicerol.

El potencial de estos metabolitos para ser empleados como biomarcadores predictivos y pronósticos de tratamiento (tabla 6 y 7) se determinó mediante el empleo de curvas ROC. La alantoína, la N-acetilglutamina, la taurina y el piruvato presentaron tanto potencial predictivo (muestras pre-tratamiento), como pronóstico (muestras post-tratamiento) de respuesta terapéutica según se los valores de área bajo la curva ROC ($AUC > 0,7$) (Figura 20). Los análisis de curvas ROC de los metabolitos individuales o en conjunto (alantoína, N-acetilglutamina, taurina y piruvato), mostraron que la taurina presentó el mayor potencial predictivo y pronóstico en nuestra cohorte de pacientes (pre-tratamiento: $AUC = 0.75$ y post-tratamiento: $AUC = 0.82$) (Figura 20). Mostrando el potencial que tienen estos 4 metabolitos de ser empleados como biomarcadores de respuesta terapéutica en el contexto de la leishmaniasis cutánea.



8.3.4. La alantoína potencia la muerte de *L.V. panamensis* mediada por el Glucantime®

La alantoína y la taurina se han descrito como metabolitos que participan en la cicatrización de heridas y como factores protectores frente al estrés oxidativo (190–192). Con base en esto, exploramos la capacidad de estos metabolitos de potenciar la muerte de *Leishmania* mediada por el antimonio, con el objeto de evaluar su potencial para ser empleados en co-terapias con el Glucantime®. Para esto, los CMSP obtenidos de pacientes con LC, se infectaron *ex vivo* con *L.V. panamensis* y se expusieron a una concentración de 10 mM taurina o alantoína, solos o en combinación con el antimonio. La exposición de los CMSP infectados a la taurina o la alantoína, no tuvo ningún efecto significativo en la carga parasitaria. De otro lado, la combinación de taurina con antimonio, tampoco diferenció la carga parasitaria respecto del control solo con antimonio. Sin embargo, cuando las células infectadas se expusieron a la alantoína en combinación con antimonio (4 µg/mL), se evidenció una reducción significativa de la carga parasitaria respecto del control con antimonio (4 µg/mL) (Figura 21), mostrando el potencial que presenta la alantoína para ser empleada en co-terapias con el antimonio. Sumando esto a su efecto cicatrizante reportado por otros autores, postula a la alantoína como una molécula con el potencial de ser empleada en el tratamiento de los pacientes con LC.

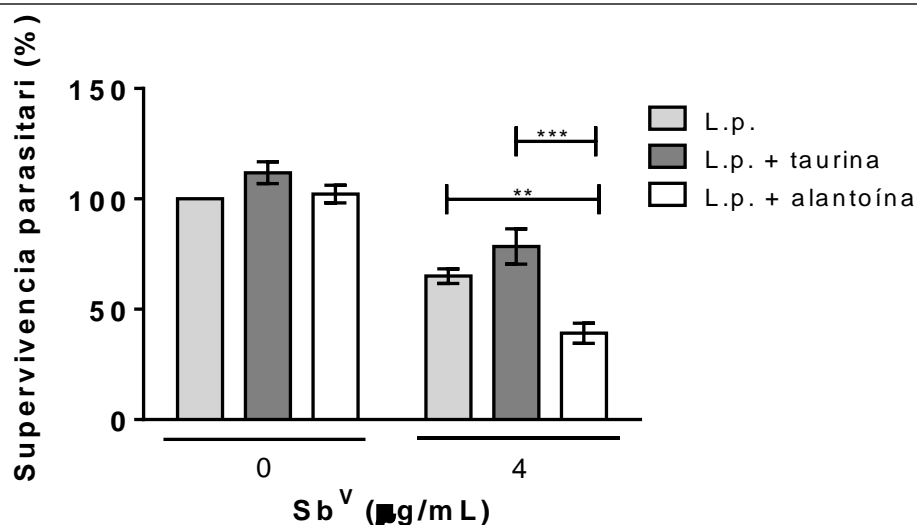


Figura 21. La alantoína potencia el efecto leishmanicida del Sb^V.

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de seis pacientes con LC se infectaron *in vitro* con *L. V. panamensis* (L.p.) durante 24h. Se adicionó taurina (10 mM) o alantoína (10 mM) solos o en combinación con Sb^V (4 µg/mL) durante 72h. La carga parasitaria se evaluó por luminometría. Se muestra el porcentaje de supervivencia del parásito en relación con las células infectadas sin droga. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student. * p < 0.05.

8.4. Discusión

A pesar de las altas tasas de falla terapéutica y de resistencia reportada frente a los antimoniales en algunas regiones del continente y del mundo, estos continúan siendo el tratamiento de primera línea frente a la LC. Para evitar la exposición innecesaria de los pacientes a estos fármacos altamente tóxicos, es indispensable contar con biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento que respalden las intervenciones terapéuticas permitiendo llegar a un manejo clínico personalizado. Actualmente, la respuesta terapéutica en pacientes con LC se evalúa a los 3-6 meses después de iniciada la terapia, dificultando el seguimiento del tratamiento y el manejo clínico de los pacientes que viven en entornos rurales dispersos. Adicionalmente, bajo estas condiciones la farmacovigilancia se hace más difícil, lo que limita la posibilidad de cambiar el tratamiento por uno más adecuado y evitar la exposición prolongada a un tratamiento que podría fallar. Por lo tanto, los biomarcadores predictivos de la respuesta terapéutica permitirán predecir que pacientes van a fallar antes

de iniciar o durante el tratamiento y ajustar la terapia, mientras los biomarcadores pronósticos permitirán anticipar que pacientes van a recaer una vez finalizado el tratamiento y después de haber presentado una cura aparente, evitando los largos periodos de seguimiento clínico.

La exposición al Sb^{V} generalmente cursa con alteración de la producción de ATP, la inducción de estrés oxidativo y osmótico, en parte debido a la producción de especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica y pérdida de integridad de la membrana (193–196). En la cohorte de pacientes se evidenció un mecanismo general de respuesta frente al estrés generado por la droga con un aumento significativo de los metabolitos que participan en la defensa frente al estrés osmótico y oxidativo. Entre estos, la betaína, D-ribosa y xantina se encontraron elevados, y disminuida de la fosfocolina al final del tratamiento en los pacientes con LC. La betaína protege contra el estrés osmótico (197) y participa en el equilibrio óxido/redox principalmente a través de la conversión de homocisteína en metionina (198). La menor abundancia de fosfocolina es consistente con el incremento de la betaína al final del tratamiento, dado que la fosfocolina es precursora de la betaína (198, 199). La D-ribosa y la xantina son metabolitos que participan en las rutas biosintéticas de las purinas. Su mayor abundancia al finalizar el tratamiento podría contribuir a la protección contra el estrés oxidativo incrementando la producción de NADPH a través de la vía oxidativa de las pentosas fosfato. Por otro lado, el recambio de nucleótidos podría aportar más sustrato a la vía (D-ribosa) y generar más NADPH. Vale la pena mencionar, que el NADPH es el sustrato clave de la enzima glutatión reductasa, la cual participa en mantener el GSH reducido, principal defensa antioxidante de la célula (200). Estos resultados proporcionan evidencia de que el metaboloma de los pacientes con LC expuestos a Glucantime® reflejan una respuesta compensatoria frente al estrés oxidativo inducido por la droga.

El mecanismo de acción de los antimoniales y la toxicidad inducida por el fármaco no se comprenden por completo (193, 201, 202). Se ha demostrado que la exposición a antimoniales conduce a la inhibición de la glicólisis y la β -oxidación de ácidos grasos, y esto se ha considerado parte de los mecanismos antileishmaniales (63, 202). Sin embargo, aún se desconoce cómo estos fármacos inhiben la β -oxidación de los ácidos grasos. Nuestros

resultados mostraron que la L-carnitina, un facilitador del transporte de ácidos grasos de cadena larga a las mitocondrias para la β -oxidación (203), estaba menos abundante al final del tratamiento en pacientes con LC, en comparación con las muestras de pre-tratamiento. Concordantemente, otros compuestos intermedios como las acilcarnitinas (3-metilglutarilcarnitina y cis-5-tetradecenoilcarnitina), asociados con la disfunción de la β -oxidación de los ácidos grasos (203–206), aumentaron después del tratamiento con Glucantime®. Estos resultados sugieren que el transporte reducido de lípidos a las mitocondrias, por la reducción de la L-carnitina, y el aumento de otras acilcarnitinas que bloquean la β -oxidación, podrían contribuir a explicar las perturbaciones inducidas por el tratamiento en la β -oxidación. Aunque estas inferencias se derivan de observaciones de muestras de plasma humano y reflejan la función del hospedero, estos mismos mecanismos también podrían explicar el bloqueo de la β -oxidación en *Leishmania*; sin embargo, esto aún no ha sido demostrado.

Por otro lado, los análisis univariados y multivariados enfocados en la identificación de biomarcadores de respuesta terapéutica en los grupos de interés (curas *versus* fallas), mostraron que la taurina, la alantoína, el piruvato y la N-acetilglutamina tienen el potencial de ser empleados como biomarcadores predictivos y pronósticos de desenlace en nuestra cohorte de pacientes. La N-acetilglutamina, la alantoína y la taurina tienen funciones claves en el control del estrés oxidativo, la regulación de la respuesta inflamatoria durante la inflamación aguda (207–210) y en la cicatrización de heridas (190–192). La alantoína, sustrato obtenido a partir de la degradación de las purinas, se ha usado como agente cicatrizante de la piel en diferentes condiciones dermatológicas (190, 211). La alantoína no es normalmente producida por los humanos, cuyo producto final de la degradación de las purinas es el ácido úrico. Sin embargo, el estrés oxidativo inducido por el Glucantime® y la respuesta inflamatoria puede dar lugar a la conversión del ácido úrico en alantoína. La mayor abundancia de taurina y alantoína encontrada en los pacientes con LC que curaron, junto con la evidencia de que la alantoína promueve la muerte del parásito mediada por antimonio, sustentan su uso en co-terapias para potenciar la muerte del parásito a la vez que acelera la curación de heridas por su papel en la inducción de proliferación celular (190–192). Finalmente, estos metabolitos identificados para ser empleados como potenciales biomarcadores de respuesta terapéutica, también podrían contribuir a la cicatrización de las

lesiones de la LC, mostrando como la modulación de factores del hospedero puede favorecer los procesos curativos y de respuesta al tratamiento.

Los perfiles metabólicos de los pacientes obtenidos a partir de muestras poco invasivas, como la recolección de suero/plasma, orina o saliva, facilita la identificación de biomarcadores con un alto potencial de ser empleados en la clínica. La implementación de la metabolómica en el estudio de las enfermedades infecciosas desatendidas apenas ha iniciado su camino. La mayoría de los estudios exploratorios para la identificación de biomarcadores diagnóstico y pronóstico en el contexto de las enfermedades desatendidas se han llevado en la tripanosomiasis (175, 212). Nuestros resultados destacan la participación de metabolitos que intervienen en la respuesta antioxidante y de cicatrización de heridas en la curación clínica de la LC, allanando el camino en este campo poco explorado de la inmunometabolómica, como herramienta para informar sobre terapias novedosas en el contexto de la leishmaniasis. La identificación de metabolitos como biomarcadores putativos de respuesta terapéutica proveen la base de referencia para validaciones posteriores en cohortes de pacientes más grandes. Este es un paso importante en la implementación de estos métodos en la clínica, los cuales se necesitan con urgencia para proporcionar enfoques terapéuticos personalizados en el tratamiento de la LC.

9. Resumen hallazgos principales

- 1) Los perfiles transcriptómicos de los macrófagos primarios aislados de pacientes con LC que curaron y fallaron al tratamiento antimonial, mostraron *in vitro* una marcada diferencia en sus perfiles de expresión génica. En los macrófagos obtenidos de los pacientes que curaron se observó un perfil principalmente pro-inflamatorio y en los macrófagos del grupo de las fallas una respuesta principalmente de cicatrización.
- 2) La inhibición de la expresión de las metolotioninas a través del silenciamiento génico de MTF-1 promovió la supervivencia intracelular de *Leishmania*, sugiriendo la participación de estas proteínas en la muerte intracelular del parásito mediada por el antimonio.
- 3) Los perfiles metabólicos del plasma de pacientes con LC permitieron postular 4 metabolitos como potenciales biomarcadores de respuesta terapéutica (taurina, alantoína, piruvato y N-acetilglutamina). De estos, la taurina mostró el mejor desempeño en predecir la respuesta terapéutica.
- 4) La alantoína, además de ser postulada como biomarcador de respuesta terapéutica, mostró un efecto potenciador de la muerte intracelular de *Leishmania V. panamensis* mediada por el antimonio en CMSP de pacientes con LC.

10. Discusión General

La aplicación de las tecnologías de alto rendimiento como la transcriptómica y la metabolómica en diferentes enfermedades infecciosas han permitido el avance sustancial en la comprensión de los mecanismos moleculares de los procesos infecciosos y la interacción hospedero-patógeno (40, 100). También se han empleado ampliamente en el descubrimiento de biomarcadores diagnósticos, predictivos y pronósticos de desenlaces clínicos y terapéuticos (213). A pesar de las grandes ventajas que ofrecen estos métodos de alto rendimiento existen limitantes en cuanto a la complejidad de la matriz de datos obtenida, las altas tasas de falsos positivos y la interpretación posterior de los datos. Esta matriz de datos generalmente cuenta con un bajo número de muestras, pero al mismo tiempo se tiene un gran número variables independientes medidas (188). En este contexto los métodos de validación -como ensayos en cohortes más grandes de pacientes, validación *in-vitro* de los candidatos identificados o confirmación de la hipótesis en modelos animales- cobran una gran importancia, permitiendo determinar con mayor certeza la utilidad de los marcadores seleccionados.

Los perfiles transcriptómicos de los macrófagos primarios aislados de pacientes con divergente respuesta terapéutica, permitieron discriminar ambos grupos acorde a los genes expresados, evidenciando una respuesta pro-inflamatoria en el grupo de las curas, y una respuesta predominantemente anti-inflamatoria en el grupo de las fallas. Una fuerte respuesta pro-inflamatorio inicial, mediada para este caso por los interferones tipo I, en los macrófagos aislados de los pacientes que curaron, sugiere que este tipo de respuesta puede ser determinante para resolver la enfermedad, contrario a lo que se observa en los macrófagos aislados de los pacientes que fallaron donde predomina una respuesta mediada por TFG- β promoviendo un estado de polarización diferente en los macrófagos donde se favorecen los procesos regulatorios, angiogénicos y de reparación del tejido. Estos perfiles de activación opuestos sugieren que la respuesta inicial de los macrófagos es central en el desenlace del tratamiento antimonial.

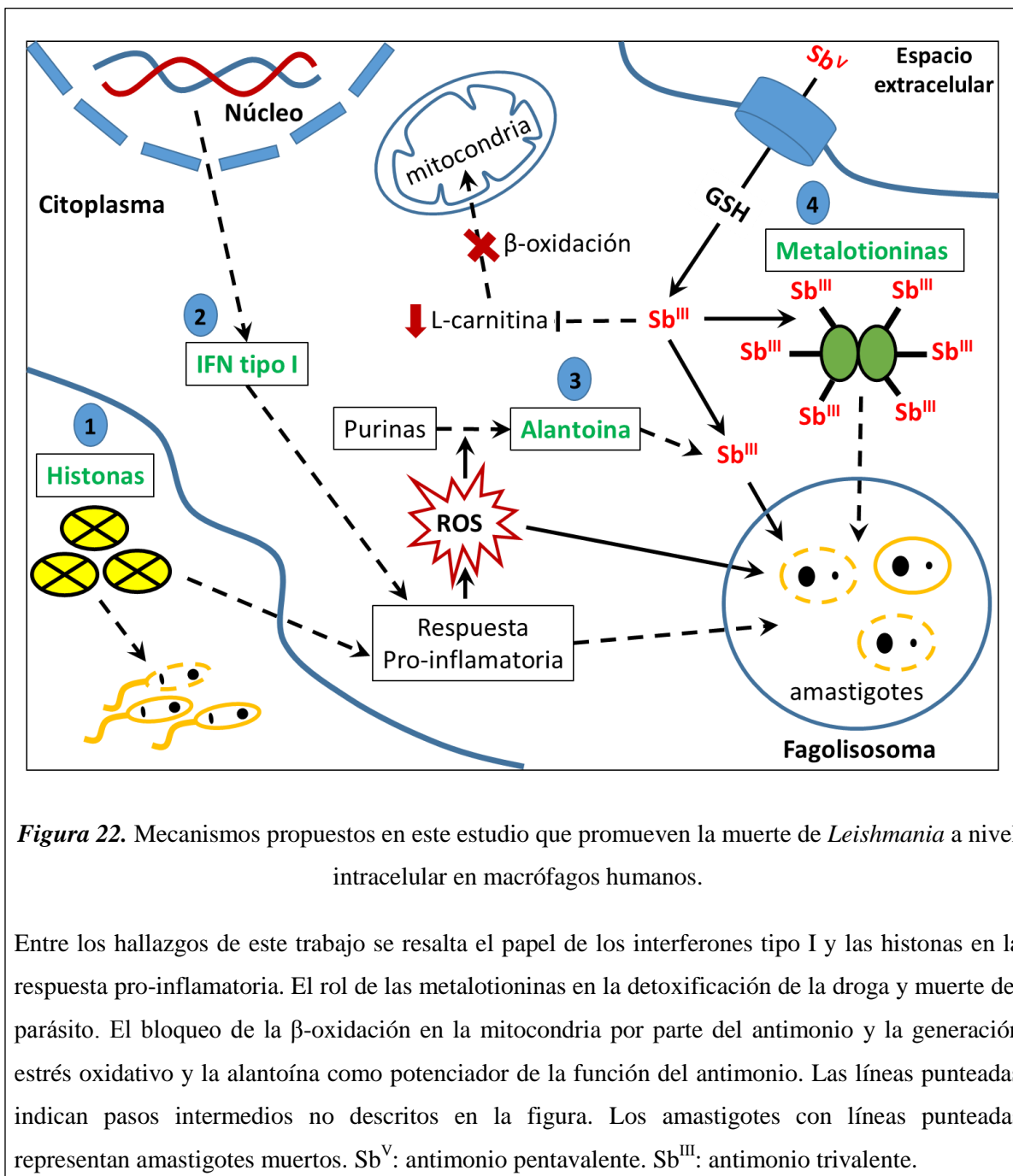
Las metalotioninas han sido descritas ampliamente por su capacidad de unir diferentes metales entre los que se encuentra el Sb (130). Estudios previos mostraron que tanto la infección por *Leishmania* como la exposición al Sb inducían fuertemente su expresión en

macrófagos. Adicionalmente, se reportó una correlación negativa entre la expresión de las metalotioninas y la supervivencia intracelular de *Leishmania* durante la exposición al Sb (28). De resaltar, en el perfilamiento transcriptómico realizado a los macrófagos de los pacientes que fallaron al tratamiento, las metalotioninas fueron la única categoría que se encontró significativamente inhibida. Para esclarecer el rol de las MTs durante la infección y el tratamiento, en este estudio validamos funcionalmente su papel empleando ARNi. Los resultados mostraron que la represión en la inducción de las metalotioninas a través del silenciamiento del factor de transcripción MTF-1, promovía la supervivencia intracelular del parásito durante la exposición *in-vitro* al antimonio. El mecanismo exacto de como esto ocurre aún está por determinarse, pero hipotetizamos que las metalotioninas favorecen la acumulación intracelular de Sb y pueden ser transportadas al fagolisosoma donde reside el parásito promoviendo su muerte, explicando en parte, porque el bloqueo su expresión aumenta la supervivencia del parásito.

Los perfiles transcriptómicos y los estudios de validación funcional ayudaron a comprender un poco mejor como se da esa interacción hospedero-parásito-droga, sin embargo, el empleo de estos perfiles transcriptómicos para predecir la respuesta terapéutica en los pacientes con leishmaniasis se aleja un poco de la realidad de la población que padece dicha enfermedad. En este orden de ideas, buscar biomarcadores más accesibles es una prioridad para esta población. Considerando la facilidad para acceder a una muestra de sangre en pacientes con LC, se empleó el estudio del metaboloma en muestras plasma para identificar biomarcadores de respuesta con potencial uso clínico futuro. Este perfilamiento metabólico permitió identificar cuatro biomarcadores con potencial de ser tanto predictores como pronósticos de respuesta terapéutica (alantoína, taurina, piruvato y N-acetilglutamina). De los metabolitos identificados como potenciales biomarcadores de respuesta terapéutica, se exploró *in-vitro* el papel de la alantoína durante la infección y la exposición a la droga, mostrando un efecto potenciador de la función del antimonio en la muerte intracelular del parásito. La alantoína cuenta con aprobación de la FDA para su uso en humanos como agente que promueve el proceso de curación de heridas en otras condiciones dermatológicas (190–192). No obstante, nunca ha sido empleada en la terapia antileishmanial, por lo que su impacto en el tratamiento de pacientes con LC amerita ser evaluado en futuros estudios.

Finalmente, el uso de herramientas ómicas de alto rendimiento en el estudio de enfermedades desatendidas como la leishmaniasis, facilitan una comprensión más global de la enfermedad que se traduce en la identificación de nuevos blancos terapéuticos y de biomarcadores con potencial uso clínico en beneficio de los pacientes.

11. Representación gráfica de los hallazgos principales del estudio.



12. Bibliografía

1. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366(9496):1561–1577.
2. Alvar J, et al. (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* 7(5):e35671.
3. Silveira Maia-Elkhoury AN, Oshiro Branco Valadas SY, Nicholls S, Buzanovsky LP, Sanchez Vazquez MJ (2017) *Organización Panamericana de la Salud: Leishmaniasis: Informe Epidemiológico en las Américas*: Available at: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34111/informe_leishmaniasis_5_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y [Accessed January 15, 2018].
4. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire (2017) Available at: <http://www.who.int/wer> [Accessed January 15, 2018].
5. Reithinger R, et al. (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 25(2):203–11.
6. WHO | Epidemiological situation (2017) *WHO*. Available at: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> [Accessed February 5, 2018].

7. Minsalud (2010) *Guía para la atención clínica integral del paciente con Leishmaniasis* (Bogotá) Available at:
<https://www.minsalud.gov.co/Documents/Salud Pública/Ola invernol/Clinica Leishmaniasis.pdf> [Accessed March 10, 2018].
8. Reveiz L, Maia-Elkhoury ANS, Nicholls RS, Sierra Romero GA, Yadon ZE (2013) Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. *PLoS One* 8(4):e61843.
9. Roberts WL, McMurray WJ, Rainey PM (1998) Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). *Antimicrob Agents Chemother* 42(5):1076–82.
10. Alvar J, Croft S, Olliaro P (2006) Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, pp 223–274.
11. ULIANA SRB, TRINCONI CT, COELHO AC (2018) Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology* 145(4):464–480.
12. Haldar AK, Sen P, Roy S (2011) Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *Mol Biol Int* 2011:1–23.
13. Soto J, et al. (2004) Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. *Source Clin Infect Dis* 38(9):1266–1272.
14. Sundar S, Chakravarty J (2015) An update on pharmacotherapy for

leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother* 16(2):237–252.

15. González U, et al. (2010) Designing and Reporting Clinical Trials on Treatments for Cutaneous Leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 51(4):409–419.
16. González U, Pinart M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J (2004) Interventions for mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, ed González U (John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK). doi:10.1002/14651858.CD004834.
17. Olliaro P, et al. (2013) Methodology of Clinical Trials Aimed at Assessing Interventions for Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 7(3):e2130.
18. Soto J, Toledo J, Vega J, Berman J (2005) Short report: Efficacy of pentavalent antimony for treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 72(4):421–422.
19. Palacios R, Osorio LE, Grajales LF, Teresa OM (2001) Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. *Am J Trop Med Hyg* 64(3):187–193.
20. Vélez I, et al. (2010) Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 83(2):351–356.
21. Sundar S, et al. (2000) Failure of pentavalent antimony in visceral

leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic.
Clin Infect Dis 31(4):1104–1107.

22. Obonaga R, et al. (2014) Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by leishmania subgenus viannia species. *Antimicrob Agents Chemother* 58(1):144–152.
23. Fernández OL, et al. (2014) Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of Leishmania Viannia Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis* 8(5):e2871.
24. Arevalo J, et al. (2007) Influence of Leishmania (Viannia) Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *J Infect Dis* 195(12):1846–1851.
25. Scott P, Novais FO (2016) Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 16(9):581–592.
26. Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR (2014) Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 8(7):e2914.
27. Navas A, et al. (2014) Chronicity of Dermal Leishmaniasis Caused by Leishmania panamensis Is Associated with Parasite-Mediated Induction of Chemokine Gene Expression. *Infect Immun* 82(7):2872–2880.

28. Gómez MA, et al. (2014) Leishmania panamensis infection and antimonial drugs modulate expression of macrophage drug transporters and metabolizing enzymes: impact on intracellular parasite survival. *J Antimicrob Chemother* 69(1):139–149.
29. Mookerjee Basu J, et al. (2008) Inhibition of ABC Transporters Abolishes Antimony Resistance in Leishmania Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 52(3):1080–1093.
30. Téllez J, Romero I, Soares MJ, Steindel M, Romanha AJ (2017) Knockdown of Host Antioxidant Defense Genes Enhances the Effect of Glucantime on Intracellular Leishmania braziliensis in Human Macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 61(7):e02099-16.
31. Bhattacharjee H, Carbrey J, Rosen BP, Mukhopadhyay R (2004) Drug uptake and pharmacological modulation of drug sensitivity in leukemia by AQP9. *Biochem Biophys Res Commun* 322(3):836–841.
32. Lee T-C, Ho I-C, Lu W-J, Huang J (2006) Enhanced Expression of Multidrug resistance-associated Protein 2 and Reduced Expression of Aquaglyceroporin 3 in an Arsenic-resistant Human Cell Line. *J Biol Chem* 281(27):18401–18407.
33. Leung J, Pang A, Yuen W-H, Kwong Y-L, Tse EWC (2007) Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells. *Blood* 109(2):740–746.

34. Kip AE, et al. (2015) Systematic Review of Biomarkers To Monitor Therapeutic Response in Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 59(1):1–14.
35. Fernández-Figueroa EA, et al. (2012) Disease Severity in Patients Infected with *Leishmania mexicana* Relates to IL-1 β . *PLoS Negl Trop Dis* 6(5):e1533.
36. Khouri R, et al. (2014) SOD1 Plasma Level as a Biomarker for Therapeutic Failure in Cutaneous Leishmaniasis. *J Infect Dis* 210(2):306–310.
37. Castro M del M, Cossio A, Velasco C, Osorio L (2017) Risk factors for therapeutic failure to meglumine antimoniate and miltefosine in adults and children with cutaneous leishmaniasis in Colombia: A cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* 11(4):1–14.
38. Martínez-Valencia AJ, et al. (2017) Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 11(7):1–15.
39. Atkinson A.J. J, et al. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69(3):89–95.
40. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G (2016) Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(7):451–

459.

41. Bartlett DW, Davis ME (2006) Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* 34(1):322–333.
42. Kamps R, et al. (2017) Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci* 18(2):308.
43. Sawyers CL (2008) The cancer biomarker problem. *Nature* 452(7187):548–552.
44. Bobbin ML, Rossi JJ (2016) RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 56(1):103–122.
45. Kamps R, et al. (2017) Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci* 18(2):308.
46. WHO (2010) Control of the Leishmaniases. World Health Organization, Geneva. *Tech Rep Ser* 949(March):22–26.
47. Fernandez-Prada C, et al. (2016) Different Mutations in a P-type ATPase Transporter in Leishmania Parasites are Associated with Cross-resistance to Two Leading Drugs by Distinct Mechanisms. *PLoS Negl*

Trop Dis 10(12):e0005171.

48. Kip AE, Schellens JHM, Beijnen JH, Dorlo TPC (2018) Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. *Clin Pharmacokinet* 57(2):151–176.
49. Miekeley N, Mortari S, Schubach A (2002) Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. *Anal Bioanal Chem* 372(3):495–502.
50. Dos Santos Ferreira C, et al. (2003) Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): A comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *BioMetals* 16(3):441–446.
51. Oliveira LF, et al. (2011) Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop* 118(2):87–96.
52. Kip AE, Schellens JHM, Beijnen JH, Dorlo TPC (2018) Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. *Clin Pharmacokinet* 57(2):151–176.
53. Echeverry MC, Milena S, Trujillo G (2005) Guía de atención de la leishmaniasis. *Minist la Prot Soc Programa Apoyo a la Reforma Salud/PARS* 21:176–219.

54. Castro M del M, et al. (2017) Pharmacokinetics of miltefosine in children and adults with Cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 61(3):1–11.
55. Steverding D (2017) The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors* 10(1):1–10.
56. Dostálová A, Volf P (2012) Leishmania development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasites and Vectors* 5(1):1–12.
57. Lainson R, Ward RD, Shaw JJ (1977) Leishmania in Phlebotomid Sandflies: VI. Importance of Hindgut Development in Distinguishing between Parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* Complexes. *Proc R Soc B Biol Sci* 199(1135):309–320.
58. Pace D (2014) Leishmaniasis. *J Infect* 69(S1):S10–S18.
59. Harhay MO, Oliaro PL, Costa DL, Costa CHN (2011) Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol* 27(9):403–409.
60. Chakravarty J, Sundar S (2010) Drug resistance in leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2(2):167.
61. Monge-Maillo B, López-Vélez R (2013) Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs* 73(17):1889–1920.

62. Berman JD, Waddel D, Hanson BD (1985) Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 27(6):916–920.
63. Berman JD, Gallalee J V, Best JM (1987) Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol* 36(2):197–201.
64. Frézard F, Monte-Neto R, Reis PG (2014) Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites. *Biophys Rev* 6(1):119–132.
65. Mandal S, Maharjan M, Singh S, Chatterjee M, Madhubala R (2010) Assessing aquaglyceroporin gene status and expression profile in antimony-susceptible and -resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* from India. *J Antimicrob Chemother* 65(3):496–507.
66. Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S, Villena I (2009) The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Mol Biochem Parasitol* 167(2):81–94.
67. Leprohon P, Légaré D, Girard I, Papadopoulou B, Ouellette M (2006) Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell* 5(10):1713–1725.

68. Leprohon P, Legare D, Ouellette M (2011) ABC transporters involved in drug resistance in human parasites. *Essays Biochem* 50:121–144.
69. Moreira DS, et al. (2013) Molecular characterization of the MRPA transporter and antimony uptake in four New World *Leishmania* spp. susceptible and resistant to antimony. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 3:143–153.
70. Arcari T, Manzano JI, Gamarro F (2017) ABCI3 Is a New Mitochondrial ABC Transporter from *Leishmania major* Involved in Susceptibility to Antimonials and Infectivity. *Antimicrob Agents Chemother* 61(12):e01115-17.
71. Moreira DS, et al. (2013) Molecular characterization of the MRPA transporter and antimony uptake in four New World *Leishmania* spp. susceptible and resistant to antimony. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 3:143–153.
72. Verma NK, Dey CS (2004) Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 48(8):3010–5.
73. Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J (2004) Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 48(3):852–859.
74. Eckford PDW, Sharom FJ (2006) P-glycoprotein (ABCB1) interacts

directly with lipid-based anti-cancer drugs and platelet-activating factors. This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled CSBMCB — Membrane Proteins in Health and Disease. *Biochem Cell Biol* 84(6):1022–1033.

75. Castanys-Muñoz E, Alder-Baerens N, Pomorski T, Gamarro F, Castanys S (2007) A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. *Mol Microbiol* 64(5):1141–1153.
76. Castanys-Muñoz E, Pérez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S (2008) Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob Agents Chemother* 52(10):3573–3579.
77. Pérez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S (2003) Functional Cloning of the Miltefosine Transporter. *J Biol Chem* 278(50):49965–49971.
78. Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ (2012) Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 67(11):2576–2597.
79. Pérez-Victoria FJ, Sánchez-Cañete MP, Castanys S, Gamarro F (2006) Phospholipid Translocation and Miltefosine Potency Require Both *L. donovani* Miltefosine Transporter and the New Protein LdRos3 in *Leishmania* Parasites. *J Biol Chem* 281(33):23766–23775.

80. Dorlo TPC, et al. (2014) Failure of Miltefosine in Visceral Leishmaniasis Is Associated With Low Drug Exposure. *J Infect Dis* 210(1):146–153.
81. Dohmen LCT, et al. (2016) Functional validation of ABCA3 as a miltefosine transporter in human macrophages: Impact on intracellular survival of *Leishmania (viannia) panamensis*. *J Biol Chem* 291(18):9638–9647.
82. Rybczynska M, et al. (2001) MDR1 causes resistance to the antitumour drug miltefosine. *Br J Cancer* 84(10):1405–1411.
83. Dorlo TPC, et al. (2011) Dynamics of parasite clearance in cutaneous leishmaniasis patients treated with miltefosine. *PLoS Negl Trop Dis* 5(12). doi:10.1371/journal.pntd.0001436.
84. Chulay JD, Bryceson ADM (1983) Quantitation of Amastigotes of *Leishmania Donovanii* in Smears of Splenic Aspirates from Patients with Visceral Leishmaniasis *. *Am J Trop Med Hyg* 32(3):475–479.
85. Schriefer A, Barral A, Carvalho EM, Barral-Netto M (1995) Serum soluble markers in the evaluation of treatment in human visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 102(3):535–540.
86. Vitale G, et al. (1992) The significance of serum soluble IL-2 receptor as a marker for active visceral leishmaniasis in Sicilian patients. *Clin Exp Immunol* 90(2):219–222.

87. Duthie MS, et al. (2014) Alteration of the serum biomarker profiles of visceral leishmaniasis during treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33(4):639–649.
88. Bourreau E, Prévot G, Gardon J, Pradinaud R, Launois P (2001) High Intralesional Interleukin 10 Messenger RNA Expression in Localized Cutaneous Leishmaniasis Is Associated with Unresponsiveness to Treatment. *J Infect Dis* 184(12):1628–1630.
89. Antonio L de F, et al. (2014) Montenegro Skin Test and Age of Skin Lesion as Predictors of Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 56(5):375–380.
90. Weigle KA, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG (1993) Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A Longitudinal Study of the Natural History, Prevalence, and Incidence of Infection and Clinical Manifestations. *J Infect Dis* 168(3):699–708.
91. Nair M, Sandhu SS, Sharma AK (2014) Prognostic and Predictive Biomarkers in Cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 14(5):477–504.
92. Jin X, et al. (2014) Diagnosis of bladder cancer and prediction of survival by urinary metabolomics. *Oncotarget* 5(6):1635–1645.
93. Ritchie S a, et al. (2010) Reduced levels of hydroxylated, polyunsaturated ultra long-chain fatty acids in the serum of colorectal cancer patients: implications for early screening and detection. *BMC*

Med 8:13.

94. Walsh MF (2016) *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer* ed Stearns V (Springer International Publishing, Cham)
doi:10.1007/978-3-319-22909-6.
95. Rogers KA, Titus RG (2004) The Human Cytokine Response to *Leishmania major* Early After Exposure to the Parasite in Vitro. *J Parasitol* 90(3):557–563.
96. Buates S, Matlashewski G (2001) General Suppression of Macrophage Gene Expression During *Leishmania donovani* Infection. *J Immunol* 166(5):3416–3422.
97. Reiner NE (1994) Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol Today* 15(8):374–381.
98. Chaussabel D, et al. (2003) Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood* 102(2):672–81.
99. Ramírez C, et al. (2012) Human Macrophage Response to *L. (Viannia) panamensis*: Microarray Evidence for an Early Inflammatory Response. *PLoS Negl Trop Dis* 6(10):e1866.
100. Fernandes MC, et al. (2016) Dual Transcriptome Profiling of

Leishmania -Infected Human Macrophages Reveals Distinct Reprogramming Signatures. *MBio* 7(3):e00027-16.

101. de Santana FR, et al. (2017) High dilutions of antimony modulate cytokines production and macrophage – Leishmania (L .) amazonensis interaction in vitro. *Cytokine* 92:33–47.
102. Kocyigit A, Gur S, Gurel MS, Bulut V, Ulukanligil M (2002) Antimonial therapy induces circulating proinflammatory cytokines in patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 70(12):6589–91.
103. Rais S, et al. (2000) Sodium Stibogluconate (Pentostam) Potentiates Oxidant Production in Murine Visceral Leishmaniasis and in Human Blood. *Antimicrob Agents Chemother* 44(9):2406–2410.
104. Kocyigit A, Gur S, Gurel MS, Bulut V, Ulukanligil M (2002) Antimonial therapy induces circulating proinflammatory cytokines in patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 70(12):6589–91.
105. Rais S, et al. (2000) Sodium Stibogluconate (Pentostam) Potentiates Oxidant Production in Murine Visceral Leishmaniasis and in Human Blood. *Antimicrob Agents Chemother* 44(9):2406–2410.
106. Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15):2114–2120.
107. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice

junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25(9):1105–1111.

108. Anders S, et al. (2013) Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat Protoc* 8(9):1765–1786.
109. Bolstad BM, Irizarry R., Astrand M, Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19(2):185–193.
110. Ritchie ME, et al. (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43(7):e47–e47.
111. Szklarczyk D, et al. (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 45(D1):D362–D368.
112. Finkielstein C V., Capelluto DGS (2016) Disabled-2: A modular scaffold protein with multifaceted functions in signaling. *BioEssays* 38(May 2015):S45–S55.
113. Prunier C, Howe PH (2005) Disabled-2 (Dab2) is required for transforming growth factor β -induced epithelial to mesenchymal transition (EMT). *J Biol Chem* 280(17):17540–17548.
114. Hornstein I, Alcover A, Katzav S (2004) Vav proteins, masters of the

world of cytoskeleton organization. *Cell Signal* 16(1):1–11.

115. Maretti-Mira AC, et al. (2012) Transcriptome Patterns from Primary Cutaneous *Leishmania braziliensis* Infections Associate with Eventual Development of Mucosal Disease in Humans. *PLoS Negl Trop Dis* 6(9):e1816.
116. Schmidt S V, et al. (2016) The transcriptional regulator network of human inflammatory macrophages is defined by open chromatin. *Cell Res* 26(2):151–170.
117. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8(12):958–969.
118. Xue J, et al. (2014) Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity* 40(2):274–288.
119. Favila MA, et al. (2014) Human Dendritic Cells Exhibit a Pronounced Type I IFN Signature following *Leishmania major* Infection That Is Required for IL-12 Induction. *J Immunol* 192(12):5863–5872.
120. Mattner J, et al. (2004) Protection against Progressive Leishmaniasis by IFN-. *J Immunol* 172(12):7574–7582.
121. Mattner J, et al. (2000) Regulation of type 2 nitric oxide synthase by type 1 interferons in macrophages infected with *Leishmania major*. *Eur*

J Immunol 30(8):2257–67.

122. Favila MA, et al. (2014) Human Dendritic Cells Exhibit a Pronounced Type I IFN Signature following *Leishmania major* Infection That Is Required for IL-12 Induction. *J Immunol* 192(12):5863–5872.
123. Beiting DP (2014) Protozoan parasites and type I interferons: a cold case reopened. *Trends Parasitol* 30(10):491–498.
124. Hoeksema M, van Eijk M, Haagsman HP, Hartshorn KL (2016) Histones as mediators of host defense, inflammation and thrombosis. *Future Microbiol* 11(3):441–453.
125. Wang Y, et al. (2011) Differential Microbicidal Effects of Human Histone Proteins H2A and H2B on *Leishmania* Promastigotes and Amastigotes. *Infect Immun* 79(3):1124–1133.
126. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell RA (2006) Transforming Growth Factor- β Regulation of Immune Responses. *Annu Rev Immunol* 24(1):99–146.
127. Vardouli L, Vasilaki E, Papadimitriou E, Kardassis D, Stournaras C (2008) A novel mechanism of TGF β -induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases. *FEBS J* 275(16):4074–4087.
128. Kardassis D, Murphy C, Fotsis T, Moustakas A, Stournaras C (2009)

Control of transforming growth factor signal transduction by small GTPases. *FEBS J* 276(11):2947–2965.

129. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell RA (2006) Transforming Growth Factor-B Regulation of Immune Responses. *Annu Rev Immunol* 24(1):99–146.
130. Nielson KB, Atkin CL, Winge DR (1985) Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J Biol Chem* 260(9):5342–50.
131. Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH (2004) Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 279(38):39925–39932.
132. Brochu C, et al. (2003) Antimony Uptake Systems in the Protozoan Parasite *Leishmania* and Accumulation Differences in Antimony-Resistant Parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 47(10):3073–3079.
133. Roesijadi G (2000) Metal transfer as a mechanism for metallothionein-mediated metal detoxification. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46(2):393–405.
134. Cousins RJ (1994) Metal Elements and Gene Expression. *Annu Rev Nutr* 14(1):449–469.
135. Coelho DR, Miranda ES, Saint’Pierre TD, Paumgarten FJR (2014) Tissue distribution of residual antimony in rats treated with multiple

- doses of meglumine antimoniate. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109(4):420–427.
136. Lima MIS, et al. (2010) Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime®. *Arch Toxicol* 84(3):227–232.
137. Barrera MC, et al. (2017) Profiling gene expression of antimony response genes in *Leishmania (Viannia) panamensis* and infected macrophages and its relationship with drug susceptibility. *Acta Trop* 176:355–363.
138. Vašák M, Meloni G (2011) Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J Biol Inorg Chem* 16(7):1067–1078.
139. Thornalley PJ, Vašák M (1985) Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* 827(1):36–44.
140. Hamer DH (1986) Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 55(1):913–951.
141. Park JD, Liu Y, Klaassen CD (2001) Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology* 163(2–3):93–100.
142. Andrews GK (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* 59(1):95–104.

143. Namdarghanbari M, Wobig W, Krezoski S, Tabatabai NM, Petering DH (2011) Mammalian metallothionein in toxicology, cancer, and cancer chemotherapy. *JBIC J Biol Inorg Chem* 16(7):1087–1101.
144. Satoh M, Aoki Y, Tohyama C (1997) Protective role of metallothionein in renal toxicity of cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 40(4):358–362.
145. Durnam DM, Palmiter RD (1981) Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *J Biol Chem* 256(11):5712–6.
146. Gregory DJ, Sladek R, Olivier M, Matlashewski G (2008) Comparison of the Effects of *Leishmania major* or *Leishmania donovani* Infection on Macrophage Gene Expression. *Infect Immun* 76(3):1186–1192.
147. Romero I, et al. (2010) Viability and Burden of *Leishmania* in Extralesional Sites during Human Dermal Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 4(9):e819.
148. Zhou H, et al. (2012) Genome-Wide RNAi Screen in IFN- γ -Treated Human Macrophages Identifies Genes Mediating Resistance to the Intracellular Pathogen *Francisella tularensis*. *PLoS One* 7(2):e31752.
149. Heuchel R, et al. (1994) The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J* 13(12):2870–5.

150. Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S (1999) METALLOTHIONEIN: An Intracellular Protein to Protect Against Cadmium Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39(1):267–294.
151. Liu J, Liu Y, Goyer RA, Achanzar W, Waalkes MP (2000) Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* 55(2):460–7.
152. Eddins D, Petro A, Pollard N, Freedman JH, Levin ED (2008) Mercury-induced cognitive impairment in metallothionein-1/2 null mice. *Neurotoxicol Teratol* 30(2):88–95.
153. Masters BA, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL, Palmiter RD (1994) Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc Natl Acad Sci* 91(2):584–588.
154. Iszard MB, et al. (1995) Characterization of Metallothionein-I-Transgenic Mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 133(2):305–312.
155. Liu YP, et al. (1995) Transgenic Mice That Overexpress Metallothionein-I Are Protected from Cadmium Lethality and Hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 135(2):222–228.
156. Liu J, et al. (2007) Blood Metallothionein Transcript as a Biomarker for Metal Sensitivity: Low Blood Metallothionein Transcripts in Arsenicosis Patients from Guizhou, China. *Environ Health Perspect* 115(7):1101–

1106.

157. Lu J, Jin T, Nordberg G, Nordberg M (2005) Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes and renal dysfunction in a population environmentally exposed to cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 206(2):150–156.
158. Boonprasert K, Ruengweerayut R, Aunpad R, Satarug S, Na-Bangchang K (2012) Expression of metallothionein isoforms in peripheral blood leukocytes from Thai population residing in cadmium-contaminated areas. *Environ Toxicol Pharmacol* 34(3):935–940.
159. Sabolić I, Breljak D, Škarica M, Herak-Kramberger CM (2010) Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *BioMetals* 23(5):897–926.
160. Moffatt P, DenizEAU F (1997) Metallothionein in Physiological and Physiopathological Processes. *Drug Metab Rev* 29(1–2):261–307.
161. Pearce LL, et al. (2000) Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(1):477–82.
162. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A (1999) Regulation of Gene Expression by Reactive Oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39(1):67–101.
163. St. Croix CM, et al. (2002) Nitric oxide-induced changes in intracellular

zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 282(2):L185–L192.

164. Stitt MS, et al. (2006) Nitric oxide-induced nuclear translocation of the metal responsive transcription factor, MTF-1 is mediated by zinc release from metallothionein. *Vascul Pharmacol* 44(3):149–155.
165. Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten LA (2006) Mammalian Zinc Transport, Trafficking, and Signals. *J Biol Chem* 281(34):24085–24089.
166. Laity JH, Andrews GK (2007) Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1). *Arch Biochem Biophys* 463(2):201–210.
167. Lichtlen P, et al. (2001) Target gene search for the metal-responsive transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res* 29(7):1514–23.
168. Kim J-H, et al. (2014) Regulation of the Catabolic Cascade in Osteoarthritis by the Zinc-ZIP8-MTF1 Axis. *Cell* 156(4):730–743.
169. Lichten LA, Ryu M-S, Guo L, Embury J, Cousins RJ (2011) MTF-1-Mediated Repression of the Zinc Transporter Zip10 Is Alleviated by Zinc Restriction. *PLoS One* 6(6):e21526.
170. Troadec M-B, Ward DM, Lo E, Kaplan J, De Domenico I (2010) Induction of FPN1 transcription by MTF-1 reveals a role for ferroportin in transition metal efflux. *Blood* 116(22):4657–4664.

171. Palmiter RD (2004) Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1. *Proc Natl Acad Sci* 101(14):4918–4923.
172. Van Weyenbergh J, et al. (2004) Zinc/copper imbalance reflects immune dysfunction in human leishmaniasis: an ex vivo and in vitro study. *BMC Infect Dis* 4(1):50.
173. Haase H, Rink L (2014) Multiple impacts of zinc on immune function. *Metallomics* 6(7):1175.
174. Mayer LS, et al. (2014) Differential impact of zinc deficiency on phagocytosis, oxidative burst, and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Metallomics* 6(7):1288.
175. Vincent IM, et al. (2016) Metabolomics Identifies Multiple Candidate Biomarkers to Diagnose and Stage Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 10(12):e0005140.
176. Tiberti N, et al. (2013) Neopterin Is a Cerebrospinal Fluid Marker for Treatment Outcome Evaluation in Patients Affected by *Trypanosoma brucei gambiense* Sleeping Sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 7(2):e2088.
177. Johnson CH, Patterson AD, Idle JR, Gonzalez FJ (2012) Xenobiotic Metabolomics: Major Impact on the Metabolome. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52(1):37–56.
178. Cancer Institute N (2009) Common Terminology Criteria for Adverse

Events (CTCAE) Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 (CTCAE). Available at:

https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf [Accessed November 2, 2017].

179. Naranjo CA, et al. (1981) A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther* 30(2):239–45.
180. WHO (2005) The use of the WHO-UMC system for standardized case causality assessment. *Uppsala Monit Cent* (3):1–3.
181. Smith CA, Want EJ, O’Maille G, Abagyan R, Siuzdak G (2006) XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal Chem* 78(3):779–787.
182. Scheltema RA, Jankevics A, Jansen RC, Swertz MA, Breitling R (2011) PeakML/mzMatch: A File Format, Java Library, R Library, and Tool-Chain for Mass Spectrometry Data Analysis. *Anal Chem* 83(7):2786–2793.
183. Creek DJ, Jankevics A, Burgess KE V, Breitling R, Barrett MP (2012) IDEOM: an Excel interface for analysis of LC–MS-based metabolomics data. *Bioinformatics* 28(7):1048–1049.
184. Sumner LW, et al. (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* 3(3):211–221.

185. Xia J, Sinelnikov I V., Han B, Wishart DS (2015) MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res* 43(W1):W251–W257.
186. Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H (2006) Probabilistic Quotient Normalization as Robust Method to Account for Dilution of Complex Biological Mixtures. Application in ^1H NMR Metabonomics. *Anal Chem* 78(13):4281–4290.
187. van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ (2006) Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7(1):142.
188. Worley B, Powers R (2012) Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics* 1(1):92–107.
189. Gonzalez-Fajardo L, Fernández OL, McMahon-Pratt D, Saravia NG (2015) Ex Vivo Host and Parasite Response to Antileishmanial Drugs and Immunomodulators. *PLoS Negl Trop Dis* 9(5):e0003820.
190. Macalister CJ (1912) A New Cell Proliferant: Its Clinical Application in the Treatment of Ulcers. *Br Med J* 1(2662):10–2.
191. Eppler B, Dawson R (2002) Cytoprotective role of taurine in a renal epithelial cell culture model. *Biochem Pharmacol* 63(6):1051–60.

192. Araújo LU, Grabe-Guimarães A, Mosqueira VCF, Carneiro CM, Silva-Barcellos NM (2010) Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cir Bras* 25(5):460–6.
193. Gebel T (1997) Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. *Chem Biol Interact* 107(3):131–44.
194. Pulido M (2003) Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 533(1–2):227–241.
195. Bento DB, et al. (2013) Oxidative stress in mice treated with antileishmanial meglumine antimoniate. *Res Vet Sci* 95(3):1134–1141.
196. Wyllie S, Fairlamb AH (2006) Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochem Pharmacol* 71(3):257–267.
197. Obeid R (2013) The Metabolic Burden of Methyl Donor Deficiency with Focus on the Betaine Homocysteine Methyltransferase Pathway. *Nutrients* 5(9):3481–3495.
198. Ganesan B, Anandan R, Lakshmanan PT (2011) Studies on the protective effects of betaine against oxidative damage during experimentally induced restraint stress in Wistar albino rats. *Cell Stress Chaperones* 16(6):641–652.
199. Ueland PM (2011) Choline and betaine in health and disease. *J Inherit*


Metab Dis 34(1):3–15.

200. Patra KC, Hay N (2014) The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci* 39(8):347–354.
201. Oliveira LF, et al. (2011) Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop* 118:87–96.
202. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH (2006) Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19(1):111–126.
203. VAZ FM, WANDERS RJA (2002) Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J* 361(3):417.
204. Wood JC, et al. (2001) Diagnosis of very long chain acyl-dehydrogenase deficiency from an infant's newborn screening card. *Pediatrics* 108(1):E19.
205. Rinaldo P, Cowan TM, Matern D (2008) Acylcarnitine profile analysis. *Genet Med* 10(2):151–156.
206. Roe CR, Millington DS, Maltby DA (1986) Identification of 3-methylglutaryl-carnitine. A new diagnostic metabolite of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency. *J Clin Invest* 77(4):1391–1394.

207. Magnusson I, et al. (1989) Utilization of intravenously administered N-acetyl-L-glutamine in humans. *Metabolism* 38(8 Suppl 1):82–8.
208. Gürer H, Özgünes H, Saygin E, Ercal N (2001) Antioxidant Effect of Taurine Against Lead-Induced Oxidative Stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 41(4):397–402.
209. Marcinkiewicz J, Kontny E (2014) Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids* 46(1):7–20.
210. Altman BJ, Stine ZE, Dang C V. (2016) From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 16(10):619–634.
211. Madrazo-Jimenez M, et al. (2016) The effects of a topical gel containing chitosan, 0,2% chlorhexidine, allantoin and despanthenol on the wound healing process subsequent to impacted lower third molar extraction. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal* 21(6):0–0.
212. Requena-Méndez A, et al. (2013) Evaluating Chagas disease progression and cure through blood-derived biomarkers: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11(9):957–976.
213. Rifai N, Gillette MA, Carr SA (2006) Protein biomarker discovery and validation: The long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* 24(8):971–983.

13. Anexos

13.1. Aval Comité de Ética


CIDEIM
CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO
E INVESTIGACIONES MÉDICAS

Recibido
5/2/18

Recibido
5-03-18

COMITE INSTITUCIONAL DE ETICA DE INVESTIGACIONES EN HUMANOS

ACTA DE RATIFICACION DE AVAL

Este documento quedará registrado en acta No.02-2018 del CIEIH

PROYECTO: "BIOMARCADORES DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON ANTIMONIALES Y MECANISMOS MOLECULARES QUE CONTROLAN LA SUPERVIVENCIA INTRACELULAR DE LEISHMANIA EN MACRÓFAGOS HUMANOS". Versión 2.

Sometido por: DENINSON ALEJANDRO VARGAS Estudiante de Doctorado Ciencias Básicas U. del Valle. María Adelaida Gómez PhD. Tutora del estudiante. CIDEIM

Fecha en que fue sometido: diciembre 23 del 2016

El CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES MEDICAS (CIDEIM), ha establecido el Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos (CIEIH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2013; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos; del departamento de salud y servicios humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

El Presidente del Comité certifica que:

1.- Con base en el ACTA DE REUNION celebrada entre CIDEIM y el Director de Postgrado de la Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, en la cual "se revisaron los procesos administrativos que deben cumplir los estudiantes de maestría y doctorado que realizan sus estudios en la U. del Valle..." "... teniendo en cuenta la Resolución 124 de junio 22 de 2007 por la cual se establece el reglamento interno académico administrativo del programa de postgrado en ciencias biomédicas de la Facultad de Salud emanado por la Vicerrectoría Académica de la U. del Valle y CIDEIM. Las conclusiones relacionadas con el aval ético de los proyectos son las siguientes:

- Cuando el trabajo de grado o la tesis que realiza el estudiante forma parte de un proyecto mayor de CIDEIM que ya cuenta con el aval del Comité de Ética de CIDEIM no será necesario solicitar un nuevo aval ético.
- Si durante el desarrollo del proyecto se introducen nuevos procedimientos con sujetos animales y humanos, que no están contemplados en el proyecto original, se debe solicitar un nuevo aval (enmienda) al Comité de Ética de CIDEIM sea al CIEIH (humanos) o CIEIA (animales).
- Si el trabajo de grado del estudiante de maestría o la tesis de doctorado hacen parte de un proyecto mayor de CIDEIM, pero los objetivos que se pretende lograr no están relacionados con los planteados en el proyecto macro, el estudiante debe presentar un nuevo proyecto que deberá ser avalado por el CIEIH o CIEIA / CIDEIM. En todo caso, esta decisión la deberá tomar el tutor (investigador) del estudiante y ante la duda se sugiere elevar consulta ante los comités de ética.

APROBADO 11 FEB 2018

13 FEB 2018



- Cada estudiante de maestría / doctorado debe tener un tutor (investigador) de CIDEIM no requiriendo tutor de la Universidad del Valle. El canal de comunicación entre la Universidad del Valle y CIDEIM será el Director de la Escuela de Postgrado de Ciencias Básicas quien informará a los tutores (investigadores) y a la Coordinación de Formación de CIDEIM, los cambios administrativos que se realicen, fechas o términos de cumplimiento y cualquier modificación que pueda afectar el proceso académico de los estudiantes de maestría.

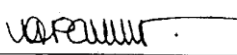
2.- Los objetivos del proyecto "BIOMARCADORES DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON ANTIMONIALES Y MECANISMOS MOLECULARES QUE CONTROLAN LA SUPERVIVENCIA INTRACELULAR DE LEISHMANIA EN MACRÓFAGOS HUMANOS", Versión 2 de febrero de 2018 que desarrolla el estudiante DENINSON ALEJANDRO VARGAS, se encuentran enmarcados dentro del siguiente estudio:

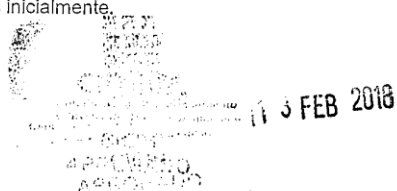
"METABOLISMO Y TRANSPORTE DE DROGAS EN MACRÓFAGOS HUMANOS Y DESENLACE TERAPÉUTICO AL TRATAMIENTO ANTILEISHMANIALES "Código 1209 aprobación vigente del CIEIH con fecha 11 de julio de 2016. El protocolo de investigación y documentos relacionados al anterior proyecto fue aprobado por el CIEIH en instancias anteriores.

3.- Todos los procedimientos incluyendo el diseño experimental, el reclutamiento de participantes, muestras obtenidas, documentos como CRF, protocolo, consentimientos y bases de datos, son los mismos diseñados e implementados para los proyectos marco, y por cuyas normas y aprobaciones se ha regido el trabajo de la estudiante.


4.- El Comité de Ética de Investigación con Humanos CIEIH / CIDEIM revisó y aprobó la versión 1 del documento. Con el fin de cumplir requisitos de orden administrativo, este comité **RATIFICA** que el aval ético otorgado al proyecto marco y a la versión 1 del documento, se extiende al trabajo de grado en versión 2 presentado por el estudiante DENINSON ALEJANDRO VARGAS. Lo anterior teniendo en cuenta que los cambios realizados son de forma y realizados a solicitud del Comité de Ética de Investigaciones de la Universidad del Valle y la Dirección de Postgrados de la Escuela de Ciencias Básicas de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, y no modifican el título de la propuesta ni los objetivos planteados inicialmente.

Firma:
Nombre:
Título:
Capacidad representativa:


Gloria I. Palma
MD. PhD
Presidente
Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos
(CIEIH) CIDEIM



Firma:
Nombre:
Título:
Capacidad representativa:


Jackeline Bravo Chamorro
Enfermera Esp.
Secretaria
Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos
(CIEIH) CIDEIM

13.2. Entrenamientos y capacitaciones

1. Effective Project planning and evaluation, UNICEF/UNDP/World Bank/WHO – TDR. CIDEIM. Febrero 2018.
2. BPC. CIDEIM. Octubre 2017.
3. *Curso de Patobiología de infecciones con microbios intracelulares*, CIDEIM-Yale University. Agosto 2017.
4. Introducción a la conducta responsable en investigación. CIDEIM- Julio 2017.
5. Análisis del metaboloma para identificación de biomarcadores de respuesta terapéutica. Pasantía internacional de 6 meses en la Universidad de Glasgow, Reino Unido. Abril - 2016.
6. Librería shARN y ARN interferente Harvard University: CIDEIM-Harvard-NIH. Enero-Abril 2014.
7. Scientific writing workshop: Sustainable Sciences Institute-CIDEIM. Noviembre 2012.
8. Protecting human research participants. Online NIH Course. Octubre 2010.

13.3. Publicaciones

2018

1. **Metabolic profiling and biomarkers of therapeutic response in patients with cutaneous leishmaniasis.** *Deninson Alejandro Vargas*, Miguel Darío Prieto, Álvaro José Martínez, Alexandra Cossio, Karl E. V. Burgess, Richard J.S. Burchmore and María Adelaida Gómez. Sometido a: mSphere.
2. **Macrophage metallothioneins participate in the antileishmanial activity of antimonials.** *Deninson Alejandro Vargas*, David J. Gregory, Rony Koren, Dan Zilberstein, María Adelaida Gómez. Sometido a: Journal of Biological Chemistry.
3. **Type I interferons mediate an early pro-inflammatory response in macrophages from therapeutically cured cutaneous leishmaniasis patients.** *Deninson Alejandro Vargas*, Laura Dillon, Najib El-Sayed, María Adelaida Gómez. En preparación para someter a: Plos One.

2016

1. **Functional Validation of ABCA3 as a Miltefosine Transporter in Human Macrophages: IMPACT ON INTRACELLULAR SURVIVAL OF *LEISHMANIA* (*VIANNIA*) *PANAMENSIS*.** Dohmen LC, Navas A, Vargas DA, Gregory DJ, Kip A, Dorlo TP, Gomez MA. J Biol Chem. 2016 Apr 29;291(18):9638-47.

2014

1. **Chronicity of Dermal Leishmaniasis Caused by *Leishmania panamensis* Is Associated with Parasite-Mediated Induction of Chemokine Gene Expression.** Adriana Navas, Deninson Alejandro Vargas, Marina Freudzon, Diane McMahon-Pratt, Nancy Gore Saravia, and María Adelaida Gómez. Infect. Immun. July 2014; 82:7 2872-2880.

2014

1. ***Leishmania panamensis* infection and antimonial drugs modulate expression of macrophage drug transporters and metabolizing enzymes: impact on intracellular parasite survival.** Maria Adelaida Gómez, Adriana Navas, Ricardo Márquez, Laura Jimena Rojas, Deninson Alejandro Vargas, Victor Manuel Blanco, Roni Koren, Dan Zilberstein, and Nancy Gore Saravia. Antimicrob. Chemother. (2014) 69 (1): 139-149.

13.4. Participación en eventos científicos

2017

1. Presentación oral: **El silenciamiento génico de las metalotioninas promueve la supervivencia intracelular de *Leishmania panamensis*.** Segunda reunión Colombiana de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes, Bogotá, Abril de 2107.

2016

1. Presentación oral: **Leishmaniasis cutánea: Biomarcadores de respuesta al tratamiento con antimoniales.** X Encuentro Nacional de Enfermedades Infecciosas-ACIN-Hotel Intercontinental, Medellín, Noviembre de 2016.

2. Presentación de Poster: **Proteomic profiling of antimony-susceptible *L. V. panamensis* strains associated with divergent therapeutic outcomes.** Deninson Alejandro Vargas, Richard Burchmore, María Adelaida Gómez. British Society for Proteome Research Meeting, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom, Julio de 2016.

13.5. Habilidades en investigación aprendidas durante el desarrollo de mi tesis en CIDEIM.

1. Manipulación de proteínas: SDS-PAGE y 2D-SDS-PAGE (2 dimensiones- sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), análisis de expresión de proteínas, evaluación de las interacciones proteína-proteína.
2. Cultivos celulares: bacterias, parásitos, hongos, células primarias humanas y líneas celulares.
3. Aislamiento y purificación de subgrupos celulares de sangre periférica humana.
4. Manipulación de ácidos nucleídos: PCR, Real Time PCR, PCR-RFLP, Southernblot, Northernblot, Clonación, ARN interferente, MLMT (Multi Locus Sequence Typing), MLST (Multilocus microsatellite typing) y PFGE (Pulse field gel electrophoresis).
5. Bioinformáticos: análisis de secuencias de nucleótidos y peptídicas, diseño de cebadores, análisis de poblaciones microbianas, genotificación, empleo de software DAVID para análisis de bases de datos de genes. Espectrometría de masas y análisis de datos de metabolómica y proteómica.
6. Buenas prácticas clínicas (GCP) y Buenas prácticas del laboratorio (GLP).
7. Preparación y escritura de trabajos presentados en eventos científicos y artículos científicos.